

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

**Der Einfluss von Corticotropin-Releasing-Factor  
auf die Dünndarmperistaltik des  
Meerschweinchens *in vitro***

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
**Karin Gudrun Höhn**  
aus Würzburg

Würzburg, Juni 2010

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

**Korreferent:** Professor Dr. rer. nat. E. Wischmeyer

**Dekan:** Herr Professor Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 03. November 2010

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Material und Methoden.....	6
2.1	Versuchsaufbau.....	6
2.2	Versuchsdurchführung.....	7
2.3	Auswertung.....	8
2.4	Statistische Auswertung .....	10
2.5	Wirkstoffe und ihre Rezeptoren .....	10
2.6	Versuchsreihen.....	12
3	Ergebnisse .....	15
3.1	Auswahl von Originalregistrierungen .....	15
3.2	Betrachtung der Agonisten .....	17
3.3	Betrachtung der Antagonisten .....	27
3.4	Betrachtung der Wechselwirkung zwischen Antagonisten und Agonisten .....	31
3.5	Betrachtung der Wechselwirkung mit Midazolam .....	36
3.5.1	Die unselektiven Substanzen.....	37
3.5.2	Die selektiven Substanzen.....	40
4	Diskussion.....	45
4.1	Betrachtung des Versuchsaufbaus, der Versuchsdurchführung und der Auswertung.....	46
4.2	Agonisten, Antagonisten und deren Wechselwirkung.....	47
4.3	Midazolam .....	49
5	Zusammenfassung.....	53
6	Summary.....	54
7	Literaturverzeichnis .....	56
8	Anhang.....	61

# 1 Einleitung

Der Dünndarm ist ein wichtiges Organ unseres Körpers. Fehlt er, ist der Mensch nicht lebensfähig, da er die aufgenommene Nahrung nicht resorbieren kann. Es resultiert eine Unterversorgung mit Nährstoffen, Vitaminen, Spurenelementen und eine Dysbalance der Wasser-Elektrolyt-Hämöostase (Schmidt et al., 2000). Die Umgehung von Unterversorgung im Sinne einer Mangelernährung stellt immer wieder eine Herausforderung im klinischen Alltag dar. Betroffen sind nicht nur ältere Menschen mit Dysphagie, sondern auch intensivmedizinisch versorgte Patienten. Für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen ist nicht nur auf deren Applikation in ausreichender Menge zu achten, sondern auch auf die Erhaltung der Fähigkeit zur intestinalen Resorption, zum aboralen Transport und die Erhaltung der intakten Standortflora. Um dies zu gewährleisten, ist die enterale Ernährung der parenteralen vorzuziehen (Herbert und Holzer, 2008).

Für eine gute Resorption ist eine adäquate Durchmischung des Chymus unerlässlich, denn so erhält möglichst viel Speisebrei Kontakt zur Oberfläche des Dünndarms. Die Durchmischung geschieht durch nichtpropulsive Peristaltik, rhythmische Pendelbewegungen und stempelartige Zottenkontraktionen (Schmidt et al., 2000). Dieser nichtpropulsiven Peristaltik steht die propulsive gegenüber. Letztere führt durch Dehnungsrezeptoren zu lokalen, reflektorischen Abwärtsbewegungen des Speisebreis (Schmidt et al., 2000) und dient dem Transport des Chymus. Selbst in Ruhephasen kommt es zu Salven von Aktionspotentialen, welche analwärts gerichtete Darmmotilität induzieren und so eine Reinigungsfunktion des Darms darstellen. Dies dient der Vermeidung von bakterieller Fehlbesiedelung in Ruhephasen des Intestinums (Schmidt et al., 2000; Fruhwald et al., 2008). Die genannte Dünndarmmotorik wird durch die Schrittmacherautomatie, das enterische Nervensystem, den Parasympathikus und den Sympathikus gesteuert (Schmidt et al., 2000).

Störungen in diesem Gleichgewicht können von Meteorismus und Obstipation bis hin zu Mangelernährung und Unterversorgung des ganzen Organismus führen. Im schlimmsten Fall findet eine bakterielle Fehlbesiedelung mit

nachfolgender Sepsis und Multiorganversagen statt. Ausgelöst werden kann dies z.B. durch pharmakologische Intervention mit Analgetika oder Hypnotika (Herbert und Holzer, 2008) oder durch Stress, wie er bei intensivmedizinisch versorgten Patienten oder im Rahmen von schweren Infektionen mit Multiorganversagen auftritt (Reintam et al., 2006; Fruhwald et al., 2007). In diesem Zusammenhang wurden gastrointestinale Störungen als Risikofaktoren für eine erhöhte Mortalität auf Intensivstationen identifiziert (Reintam et al., 2006). Mit der Länge des Aufenthalts nimmt die Wahrscheinlichkeit, eine gastrointestinale Störung zu entwickeln, zu. So hatten etwa 80% der Patienten nach einer Woche gastrointestinale Störungen.

Die Intensivmedizin führt nahezu immer zu einer Stressreaktion des Körpers. In solchen Situationen wird u.a. Kortisol ausgeschüttet, das Einfluss auf die Corticotropin-Releasing-Factor-Produktion im Hypothalamus hat. 1981 wurde der Corticotropin-Releasing-Factor (CRF) als ein 41 Aminosäuren langes Peptid charakterisiert. Es stimuliert u.a. die Synthese und Sekretion von ACTH (Adreno-Corticotropes-Hormon) aus der Hypophyse (Vale et al., 1981). CRF ist in die Hypothalamus-Hypophysen-Achse eingebunden und steuert über ACTH die Kortisolfreisetzung (Schmidt et al., 2000; Bradley et al., 2008), diese reguliert über einen negativen Feedback-Mechanismus die CRF- und ACTH-Sekretion. Nicht nur im erwähnten Hypothalamus-Hypophysen-Regelkreis sind CRF und seine Rezeptoren involviert, sondern auch in extrakraniellen Geweben, z.B. im Herzen, in Gefäßen und im Gastrointestinaltrakt (Perrin und Vale, 1999; Muramatsu et al., 2000; Lawrence et al., 2002; Rivier et al., 2007). Hier wurde zusätzlich ein CRF-ähnliches Peptid, das Urocortin, identifiziert (Martínez et al., 2004a).

CRF selbst bindet u.a. im Gastrointestinaltrakt an CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren. Als Liganden für diese Rezeptoren fungieren nicht nur CRF, Urocortin I und Astressin als unselektive Bindungspartner, sondern auch Urocortin II und III sowie Stressin, K 41498 und NBI 27914 als selektive Liganden mit agonistischer oder antagonistischer Funktion (**Kap. 2.5**). Hierbei kann zwischen physiologischen (CRF, Urocortin II) und synthetischen (Astressin, Stressin, K 41498, NBI 27914) Liganden unterschieden werden.

Der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor befindet sich hauptsächlich im Colon und seine Aktivierung führt zur Motilitätssteigerung, zur Verkürzung der Passagezeit des Darminhalts und zur Beschleunigung der Defäkation (Maillot et al., 2000; Million et al., 2002; Martínez et al., 2002 u. 2004b; Taché et al., 2004). Ein Einfluss des Rezeptors auf die gastrale Motilität konnte nicht nachgewiesen werden. Die vielfach beobachtete viscerale Hyperalgesie des Magen-Darm-Traktes (insbesondere des Colons) im Rahmen entzündlicher Erkrankungen, wird ebenfalls durch Aktivierung von CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren ausgelöst (Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004a). Eine weitere Funktion ist die Erhöhung der Permeabilität des Jejunum-, Ileum- und Colonepithels (Söderholm und Perdue, 2001; Taché et al., 2004; Bhatia und Tandon, 2005). Dies sorgt für eine vermehrte Abgabe von u.a. H<sub>2</sub>O, Ionen und Mucus ins Lumen. Unter extremen (r/h)-CRF- und Stressin-Dosen kommt es zur wässrigen Diarrhoe (Söderholm und Perdue, 2001; Taché et al., 2004; Liu et al., 2005; Rivier et al., 2007).

Der CRF<sub>2</sub>-Rezeptor ist im Magen lokalisiert. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zur Hemmung der Magenentleerung und zur Herabsetzung der Kontraktilität. Eine Beeinflussung der Colonmotilität durch isolierte CRF<sub>2</sub>-Rezeptoraktivierung konnte nicht nachgewiesen werden (Maillot et al., 2000; Million et al., 2002; Martínez et al., 2002 u. 2004b; Taché et al., 2004).

Eine exakte Lokalisierung der Rezeptorsubpopulationen gelang bisher noch nicht. Hier finden sich teilweise widersprüchliche Aussagen. Die CRF<sub>1</sub>-Population wurde im Plexus submucosus und myentericus im Colon der Ratte lokalisiert (Taché et al., 2004). Die CRF<sub>2</sub>-Rezeptorpopulation konnte in beiden Plexus des Magens der Ratte nachgewiesen werden (Million et al., 2002). Im Duodenum und Ileum der Ratte wurde sowohl der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor als auch der CRF<sub>2</sub>-Rezeptor gefunden (Porcher et al., 2005). Das Verteilungsmuster der jeweiligen Subpopulation lässt auf einen erhöhten CRF<sub>1</sub>-Anteil im Duodenum und einen erhöhten CRF<sub>2</sub>-Anteil im Ileum schließen. Hauptsächlich erfolgt die Rezeptoraktivierung über G-Proteine, aber auch ein direkt neuronal vermittelter Weg wird diskutiert (Hanani und Wood, 1992; Million et al., 2002; Lázár et al., 2003; Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004b; Liu et al., 2005; Porcher et al.,

2005). Ein exakter molekularbiologischer Interaktionsweg für (r/h)-CRF und seiner verwandten Peptide wurde bislang noch nicht beschrieben.

Aus der Literatur ist ersichtlich, dass die Aktivierung der G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelten CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren zu einer Aktivierung von Adenylatcyclasen führen kann (Perrin und Vale, 1999; Million et al., 2002; Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004b). Dies führt zur Bildung von intrazellulärem cAMP (Berg et al., 2003; Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004a), welches an die Proteinkinase A bindet und diese kann im aktivierten Zustand Enzyme, Ionenkanäle und bestimmte Genexpressionsmuster aktivieren (Berg et al., 2003).

In sensorischen Neuronen führt die Bildung von cAMP nach Bindung an die entsprechende Proteinkinase zur Phosphorylierung eines Kalziumkanals, welcher seinerseits eine Transmittersekretion induziert (Schmidt et al., 2000). Auf ähnliche Weise könnte die von einigen Autoren beschriebene Acetylcholinsekretion in Zusammenhang mit der (r/h)-CRF-verwandten Peptid-Applikation erklärt werden (Hanani und Wood, 1992; Lázár et al., 2003; Martínez et al., 2004a; Liu et al., 2005). Acetylcholin könnte an den nicotinergen Rezeptoren der glatten Muskulatur über eine Membrandepolarisation zu einer Kontraktion führen (Hanani und Wood, 1992; Pan und Gershon, 2000; Brookes, 2001).

Im Zentralnervensystem wurden verschiedene G-Proteine nachgewiesen, die alle durch CRF<sub>1</sub>- oder CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren aktiviert werden können (Brar et al., 2004). Ihre Aktivierung führt zu einer MEK1 (MAP-Kinase, mitogen-activated protein)-vermittelten Phosphorylierung der Kinasen ERK<sub>1/2</sub>-p42, 44 (Serin- / Threonin-Proteinkinasen). ERK<sub>1/2</sub>-p42, 44 leiten transkriptionelle Veränderungen ein und sind im Allgemeinen in viele Schritte des Zellzyklus involviert. Die oben erwähnten CRF-Rezeptor-gekoppelten G-Proteine sind adenylatcyclaseaktivierend oder über die Phospholipase C an die second messenger IP<sub>3</sub> (Inositol-Trisphosphat) und DAG (Diacylglycerin) gebunden (Brar et al., 2004). Eine Co-Aktivierung mehrerer G-Proteine wäre im Ileum denkbar. IP<sub>3</sub> und DAG sind dafür bekannt, die intrazelluläre Kalziumfreisetzung zu aktivieren, worauf eine Kontraktion der glatten Muskulatur folgt (Berg et al., 2003).

Die Erhöhung der Jejunum- und Ileumpermeabilität könnte direkt über den Plexus submucosus durch CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren (Taché et al., 2004; Liu et al., 2005) induziert werden oder ein Nebenprodukt einer (r/h)-CRF-induzierten über cholinerge Neurone vermittelten Acetylcholinsekretion (Söderholm und Perdue, 2001; Lázár et al., 2003) sein.

Diese Acetylcholinsekretion tritt häufig in Verbindung mit der Applikation von (r/h)-CRF auf (Lázár et al., 2003; Martínez et al., 2004a; Liu et al., 2005). Ob Acetylcholin eine Rolle als Transmitter in dem durch (r/h)-CRF und seine verwandten Peptide induzierten Signalweg spielt und wie es aktiviert wird, ist nicht geklärt. Auch ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen Acetylcholin und (r/h)-CRF-verwandten Peptiden wie beispielsweise zwischen  $\beta$ -Adrenorezeptoren und  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren (Schmidt et al., 2000) könnte postuliert werden.

Denkbar ist auch, dass die Aktivierung einer der beiden CRF-Rezeptoren den jeweils anderen beeinflusst. Beide Rezeptoren könnten sich in einer Art Aktivitätsgleichgewicht befinden und sich bei Inbalancen gegenseitig modulieren (Brookes, 2001; Martínez et al., 2004a). Dies wird als sogenannter cross-talk bezeichnet (Brookes, 2001; Martínez et al., 2004a).

Insgesamt gibt es viele Studien, die sich mit der Reaktion des Magens und Colons von Ratten und Mäusen auf (r/h)-CRF und seine verwandten Peptide beschäftigen. Zur Reaktion des Meerschweinchendünndarms auf diese Peptide gibt es nur sehr wenige Veröffentlichungen, obwohl sich dieses Organ aufgrund seiner morphologischen, elektrophysiologischen und mechanischen Eigenschaften besonders gut eignet, um neuronale und muskuläre Aktivität zu untersuchen (Brookes, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von (r/h)-CRF, natürlichen und synthetischen Agonisten und Antagonisten auf die Peristaltik des Dünndarms untersucht. Des Weiteren werden Wechselwirkungen zwischen Stressmediatoren und dem klinisch zur Sedierung von Intensivpatienten eingesetzten Benzodiazepin Midazolam untersucht. Ziel ist es, das Vorhandensein CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelter Signalwege zu prüfen, eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung herauszuarbeiten, die Wirkung verschiedener Agonisten /



Antagonisten sowie deren Wechselwirkung zu evaluieren und mögliche Wechselwirkungen mit dem Benzodiazepin Midazolam zu erfassen. Der experimentelle Ansatz wurde bereits mehrfach zur Beobachtung von Interaktionen am Meerschweinchendünndarm eingesetzt und hat sich bewährt (Holzer und Maggi, 1994; Waterman et al., 1994).

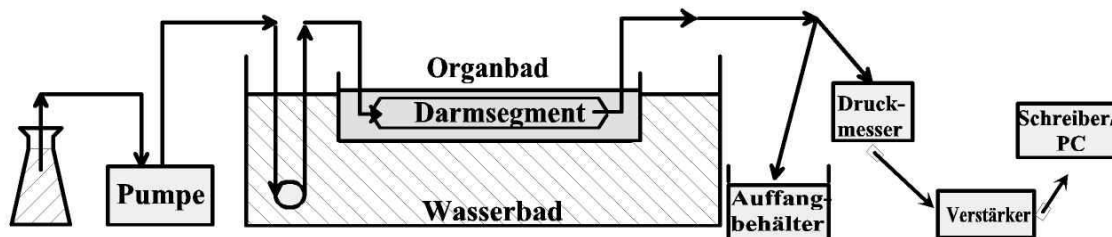
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsaufbau

Für die Untersuchungen werden sowohl männliche als auch weibliche Meerschweinchen (BFA-Stamm, Lieferant Charles River Wiga, Sulzfeld) von jeweils 350g bis 500g verwendet. Die Tiere werden durch einen Genickschlag betäubt. Anschließend erfolgt die Durchtrennung der Carotiden. Nach dem Ausbluten der Tiere wird der Bauchraum eröffnet und die Präparation des Jejunums und des Ileums vorgenommen. Es werden jeweils 10 cm Darmgewebe vom Magen bis zum Jejunum und vom Ileum bis zur Ileocoecalklappe belassen. Das aborale Ende wird mit einem Faden markiert. Im Anschluss wird das Präparat in eine bereitgestellte Schale mit 37°C warmer Tyrodelösung (**Kap. 2.5**) eingebracht, segmentiert, nummeriert und mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Zentrales Element des Versuchsaufbaus **Abb. 1** ist das Organbad innerhalb des Wasserbades (Temperatur 37°C). In dem Wasserbad können bis zu fünf Organbäder / Segmente gleichzeitig registriert werden. Jedes Organbad enthält ein Dünndarmsegment in 30 ml Tyrodelösung.

In das Wasserbad führt ein Schlauchsystem, welches durch eine Pumpe mit Tyrodelösung perfundiert wird. Nach Eintritt des Schlauchsystems in das Wasserbad erfolgt dessen spiralförmige Wickelung, um eine Erwärmung auf 37°C zu gewährleisten. Anschließend wird es mit dem oralen Ende eines Dünndarmsegments im Organbad verbunden. Das aborale Ende ist durch ein y-förmiges Schlauchstück sowohl an einen Druckmesser als auch an einen Auffangbehälter konnektiert. Der Auffangbehälter enthält die durch die Peristaltik weitertransportierte Tyrodelösung. Der Druckmesser gibt ein Signal

über einen Analog / Digital-Wandler (Combitrans, Fa. Braun) an einen 6-Kanal-Schreiber (Multi-Pen Recorder, Fa. Rikadenki) und den PC zur Registrierung weiter. Der erwähnte Druckmesser befindet sich entweder auf dem selben Niveau wie der Dünndarm oder 4 cm oberhalb. Diese Höhendifferenz entspricht jeweils einem Druckgradienten von 400 Pa und dient der Kalibrierung.



**Abb. 1: Vereinfachtes Schema des Versuchsaufbaus**

## 2.2 Versuchsdurchführung

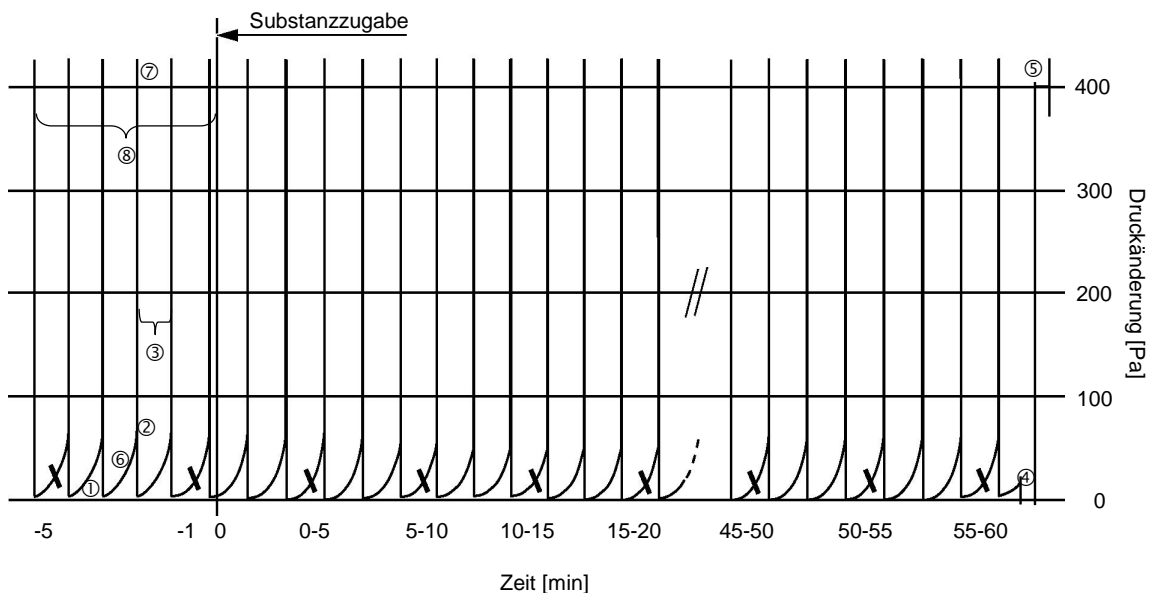
Zuerst wird der Dünndarm in Segmente von ungefähr 10 cm unterteilt und am aboralen Ende mit einem Faden markiert. Je nach Größe des Tieres erhält man 6 bis 10 Segmente.

Das orale Ende wird mit dem Tyrodelösung-zuführenden-Schlauchsystem verbunden und vorsichtig gespült, um den kontaminierenden Kot aus dem Darmsegment und dem Versuchsaufbau zu entfernen. Nun wird das aborale Ende mit dem y-förmigen Schlauchstück verbunden und mit Carbogen begast. Da das Präparat sehr empfindlich auf exogene Reize reagiert, wird zunächst eine 10-minütige Ruhephase eingehalten. Im Anschluss wird die Pumpe zugeschaltet und nach weiteren 5 bis 10 Minuten eventuell noch vorhandene Fäkalien durch vorsichtiges Spülen entfernt. Nach insgesamt 30 Minuten erfolgt ein Austausch der Tyrodelösung des Organbads. Nach weiteren 10 Minuten wird der Druckmesser, der sich auf Niveau des Dünndarms befindet (Druck = 0 Pa), auf 4 cm (400 Pa) angehoben. Dieser Widerstand löst den Peristaltikreflex (Schmidt et al., 2000) aus. Mit dem 6-Kanal-Schreiber bzw. PC werden die Druckänderungen aufgezeichnet (**Abb. 2**). Je nach Segment benötigt es etwas Zeit bis sich der Darm an das Druckniveau gewöhnt hat und sich regelmäßig kontrahiert. Man wartet 5-6 regelmäßige Kontraktionen

(mindestens 10 Minuten) ab, gibt die zu prüfende Substanz dem Organbad zu und registriert weitere 60 Minuten. Werden Wechselwirkungen zwischen zwei Substanzen untersucht, gibt man 20 Minuten nach der ersten die zweite Substanz ins Bad und zeichnet insgesamt 80 Minuten auf. Nach 60 bzw. 80 Minuten Registrierung erfolgt die Kalibrierung des Systems (**Kap. 2.3**). Zunächst wird durch Durchtrennen des Dünndarms direkt am aboralen Ende kurz vor dem y-förmigen Schlauchstück der Druck im Organbad bestimmt (**Abb. 2**, Nummer 4). Im Anschluss wird dieses Schlauchstück abgeklemmt, um den Druck in der Wassersäule des Druckmessers zu erhalten (**Abb. 2**, Nummer 5). Mit dieser Messung wird das Experiment beendet.

Wie bereits erwähnt erhält man pro Tier 6 bis 10 Dünndarmsegmente. Zu jedem dieser Segmente wird eine unterschiedliche Substanz oder Substanzkonzentration gegeben. Insgesamt wird jede Substanz an acht verschiedenen Darmsegmenten getestet. In jedem Durchgang läuft eine Tyrodelösungskontrolle mit.

## 2.3 Auswertung



**Abb. 2: Registrierung der intraluminalen Druckänderung**

- |                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| ① Wendepunkt                    | ⑤ Druck in der Wassersäule |
| ② Schwellenwert ( $\Delta$ PPT) | ⑥ Füllung des Darmlumens   |
| ③ Frequenz                      | ⑦ Druckspitze              |
| ④ Druck im Organbad             | ⑧ Vorlauf                  |

Für die Auswertung wird zunächst ein Koordinatensystem in die Schreiberkurve gelegt (**Abb. 2**). Die Nulllinie wird durch zwei Punkte definiert. Das Druckniveau im Organbad (**Abb. 2**, Nummer 4) stellt den ersten Punkt dar. Der Zweite ist der niedrigste Wendepunkt (**Abb. 2**, Nummer 1) im gemessenen Intervall von -5 bis 60 Minuten. Das gemessene Zeitintervall beinhaltet die erwähnten 5 bis 6 regelmäßigen Kontraktionen (10 Minuten Vorlauf) vor Substanzzugabe und die darauffolgenden 60 Minuten unter Substanzwirkung. Durch die im Vorfeld durchgeführte Kalibrierung (**Kap. 2.1**) kann eine Umrechnung der Millimeterangaben des Schreibers in Pascal erfolgen.

Vom Zeitpunkt -5 (**Abb. 2**) ausgehend, werden in 5-minütigen Intervallen Wendepunkt,  $\Delta$  PPT (peristaltic pressure threshold oder Schwellenwert) und Frequenz gemessen (**Abb. 2**, Nummer 3). Zum Zeitpunkt Null erfolgt die Substanzzugabe.

Eine Kontraktion beginnt mit dem Wendepunkt (**Abb. 2**, Nummer 1), bei dem der intraluminale Druck am niedrigsten ist und sich keine oder wenig Flüssigkeit im Darmlumen befindet. Nach dem Erreichen des Wendepunkts beginnt die Füllungsphase, in welcher der intraluminale Druck des Ileums stetig zunimmt (**Abb. 2**, Nummer 6). Ist die maximale Wandspannung erreicht, wird reflektorisch eine peristaltische Welle ausgelöst und der Darm entleert sich. Der Punkt, an dem die maximale Wandspannung erreicht wird, wird als  $\Delta$  PPT (**Abb. 2**, Nummer 2) bezeichnet. Durch die reflektorische Kontraktion des Darms wird dessen Inhalt mit entsprechendem Druck aus dem Darmlumen befördert. Dies wird in **Abb. 2** (Nummer 7) durch die hohen Druckspitzen dargestellt. Anschließend entfaltet sich der Darm wieder, der Druck nimmt ab und es wird der Wendepunkt erreicht. Hier beginnt die nächste Kontraktion. Die Frequenz stellt die zeitliche Abfolge der einzelnen Kontraktionen dar. Sie wird vom Wendepunkt bis zum Wendepunkt der darauf folgenden Kontraktion gemessen. Als Vorlauf werden die Kontraktionen vor Substanzzugabe (**Abb. 2**, Nummer 8) bezeichnet.

Neben dem  $\Delta$  PPT können nach Auswertung der Originalregistrierungen noch andere Parameter bestimmt werden: Das  $\Delta P_{\text{Peak}}$  [Pa] beschreibt die stärkste

Druckänderung. Die mittlere Latenz bis zum Peak [min] gibt das dazugehörige Zeitintervall bis zum Erreichen des Zeitpunkts der stärksten Wirkung an. Das  $\Delta$  PPT über 20 und 60 Minuten beschreibt die größte Druckänderung in einem 20 oder 60 Minutenintervall nach Substanzzugabe. Verallgemeinernd wird auch vom  $\Delta$  PPT über die Zeit gesprochen.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit den Programmen Sigmastat 32 (Fa. SPSS Inc., Erkrath) und Excel (Office 2000, Fa. Microsoft). Die  $\Delta$  PPT-Werte werden mit dem Kolmogoroff-Smirnow-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) dargestellt. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgt bei multiplen Vergleichen mittels ANOVA (analysis of variance) und *post hoc* Student-Newman-Keuls-Test, bei Vergleich zweier Gruppen mit dem Student-t-Test auf dem Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

Die Ergebnisse der Versuchsreihen werden als Mittelwertskurven oder Balkendiagramme mit zugehörigem Standardfehler dargestellt (Programm Excel, Office 2000, Fa. Microsoft).

## 2.5 Wirkstoffe und ihre Rezeptoren

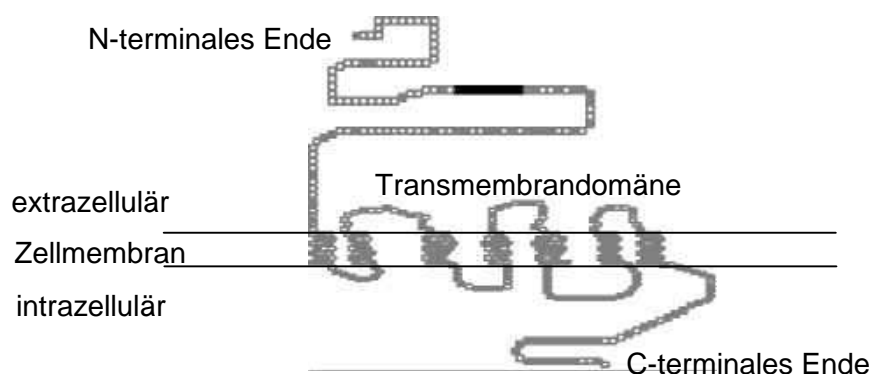
Es werden die Wirkstoffe (r/h)-CRF, Astressin, Stressin, Urocortin II, NBI 27914 und K 41498 verwendet. Sie alle wirken unterschiedlich auf die Rezeptorsubtypen CRF<sub>1</sub> und CRF<sub>2</sub>. Zusätzlich wird die Interaktion mit diesen selektiven und unselektiven Liganden in Kombination mit Midazolam untersucht.

Nachstehend sind die Eigenschaften der oben genannten Wirkstoffe aufgelistet:

- *Tyrodellösung* ist eine physiologische Lösung. Sie besteht aus destilliertem Wasser, 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 1,0 mM MgCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 11,9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O und Glucose.

- *(r/h)-CRF* ist ein unselektiver Agonist. Er besteht aus 41 Aminosäuren und wird u.a. im Hypothalamus gebildet. r/h bezieht sich auf die Herkunft des Peptids (in diesem Fall rat / human). *(r/h)-CRF* weist eine größere Affinität zu CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren als zu CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren auf (Million et al., 2002; Martínez et al., 2002 und 2004b; Taché et al., 2004; la Fleur et al., 2005; Stengel und Taché, 2009).
- *Stressin* ist ein selektiver peptidischer CRF<sub>1</sub>-Agonist. Er wurde durch gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz von *Astressin* entwickelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass *Stressin* der potenteste selektive Agonist ist (Rivier et al., 2007; Stengel und Taché, 2009).
- *Urocortin II* ist ein selektiver peptidischer CRF<sub>2</sub>-Agonist. Er besteht aus 38 Aminosäuren und kommt u.a. im Hypothalamus vor. Aus der Urocortinfamilie besitzt *Urocortin II* nicht die größte Affinität zum CRF<sub>2</sub>-Rezeptor. Da es jedoch die Adenylatcyclase am stärksten aktiviert, ist es der potenteste CRF<sub>2</sub>-Agonist (Perrin und Vale, 1999; Martínez et al., 2002 und 2004b; Taché et al., 2004; Stengel und Taché, 2009).
- *Astressin* ist ein unselektiver peptidischer Antagonist an CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die Affinität zu beiden CRF-Rezeptoren ist gleich hoch (Martínez et al., 1999 und 2002; Hoare et al., 2004; Taché et al., 2004).
- *NBI 27914* ist ein selektiver CRF<sub>1</sub>-Antagonist. Er wurde durch Veränderung der Aminosäuresequenz des *Astressins* entwickelt und zählt zu den nicht-peptidischen Antagonisten. Eine Antagonisierung mit *(r/h)-CRF* am Organ ist nur teilweise möglich, wahrscheinlich wegen seiner nichtpeptidischen Eigenschaften (Martínez et al., 2002; Hoare et al., 2003; Taché et al., 2004).
- *K 41498* ist ein selektiver peptidischer CRF<sub>2</sub>-Antagonist. Er wurde durch chemische Veränderung von *Antisauvagine-30* synthetisiert und hat sich als Antagonist bewährt (Lawrence et al., 2002).
- *Midazolam* ist ein tetrazyklisches Benzodiazepin mit kurzer Plasaeliminationshalbwertszeit (1,5 h bis 3 h; Lüllmann et al., 2003).

Die aufgeführten Substanzen binden alle, bis auf Midazolam, an CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die beiden CRF-Rezeptoren besitzen eine 70% Sequenzhomologie auf Aminosäureebene (Stengel und Taché, 2009). Subgruppen dieser beiden Rezeptortypen werden arabisch und griechisch untergliedert, z.B. CRF<sub>1α, β, c-h</sub>, CRF<sub>2α, β, γ</sub>-Rezeptoren. Nichtpeptidische Agonisten und Antagonisten haben andere Bindungseigenschaften und -orte als peptidische (**Abb. 3**). Letztere können u.a. nicht die Bluthirnschranke (Perrin und Vale, 1999; Taché et al., 2004) überwinden.



**Abb. 3: CRF-Rezeptor (aus Hauger et al., 2003)**

Am N-terminalen Ende erfolgt die Ligandenbindung der Agonisten (Stengel u. Taché, 2009) und der peptidischen Antagonisten, während nichtpeptidische Antagonisten an der Transmembrandomäne binden (Perrin u. Vale, 1999).

## 2.6 Versuchsreihen

### Versuchsreihe 1: (r/h)-CRF

10 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	(r/h)-CRF 1 nM	n=8
Vorlauf	(r/h)-CRF 10 nM	n=8
Vorlauf	(r/h)-CRF 100 nM	n=8
Vorlauf	(r/h)-CRF 300 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	n=8

## Versuchsreihe 2: Stressin

10 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	Stressin 1 nM	n=8
Vorlauf	Stressin 10 nM	n=8
Vorlauf	Stressin 30 nM	n=8
Vorlauf	Stressin 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	n=8

## Versuchsreihe 3: Urocortin II

10 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	Urocortin II 1 nM	n=8
Vorlauf	Urocortin II 10 nM	n=8
Vorlauf	Urocortin II 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	n=8

## Versuchsreihe 4: Astressin

10 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	Astressin 1 nM	n=8
Vorlauf	Astressin 10 nM	n=8
Vorlauf	Astressin 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	n=8

## Versuchsreihe 5: NBI 27914

10 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	NBI 27914 1 nM	n=8
Vorlauf	NBI 27914 10 nM	n=8
Vorlauf	NBI 27914 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	n=8



### Versuchsreihe 6: K 41498

10 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	K 41498 1 nM	n=8
Vorlauf	K 41498 10 nM	n=8
Vorlauf	K 41498 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	n=8

### Versuchsreihe 7: Antagonisierung von (r/h)-CRF durch Astressin

10 Minuten	20 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	Astressin 100 nM	(r/h)-CRF 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	(r/h)-CRF 100 nM	n=8

### Versuchsreihe 8: Antagonisierung von Stressin durch NBI 27914

10 Minuten	20 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	NBI 27914 100 nM	Stressin 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	Stressin 100 nM	n=8

### Versuchsreihe 9: Antagonisierung von Urocortin II durch K 41498

10 Minuten	20 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	K 41498 100 nM	Urocortin II 100 nM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	Urocortin II 100 nM	n=8

### Versuchsreihe 10: Interaktion von (r/h)-CRF und Astressin mit Midazolam

10 Minuten	20 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	(r/h)-CRF 1 nM	Midazolam 10 µM	n=8
Vorlauf	(r/h)-CRF 10 nM	Midazolam 10 µM	n=8
Vorlauf	Astressin 100 nM	Midazolam 10 µM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	Midazolam 10 µM	n=8

## Versuchsreihe 11: Interaktion von Stressin und Urocortin II mit Midazolam

10 Minuten	20 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	Stressin 1 nM	Midazolam 10 µM	n=8
Vorlauf	Urocortin II 1 nM	Midazolam 10 µM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	Midazolam 10 µM	n=8

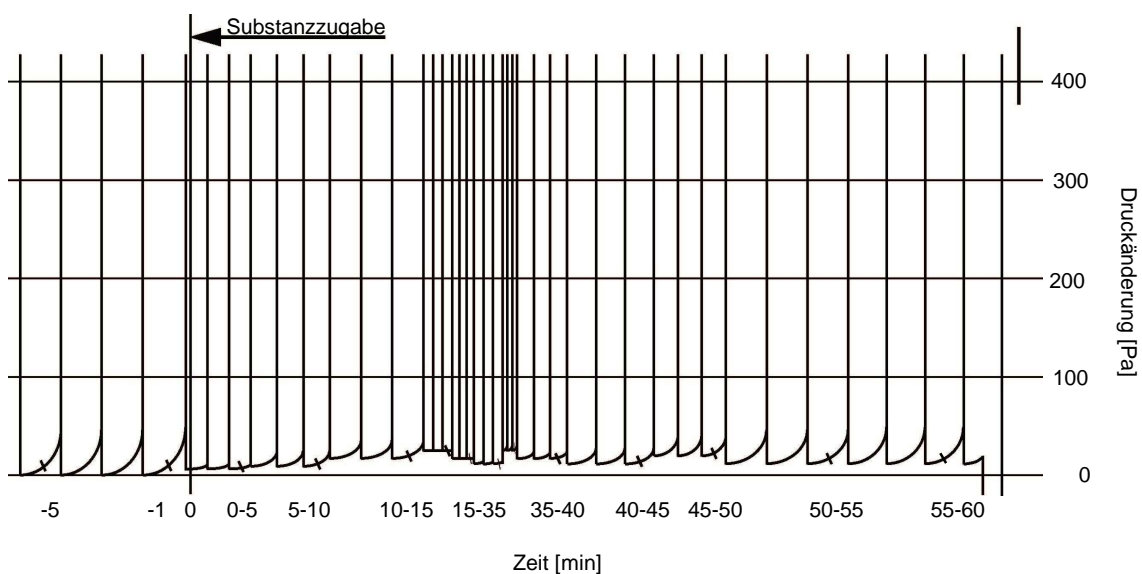
## Versuchsreihe 12: Interaktion von K 41498 und NBI 27914 mit Midazolam

10 Minuten	20 Minuten	60 Minuten	Anzahl
Vorlauf	K 41498 100 nM	Midazolam 10 µM	n=8
Vorlauf	NBI 27914 100 nM	Midazolam 10 µM	n=8
Vorlauf	Tyrodelsg.	Midazolam 10 µM	n=8

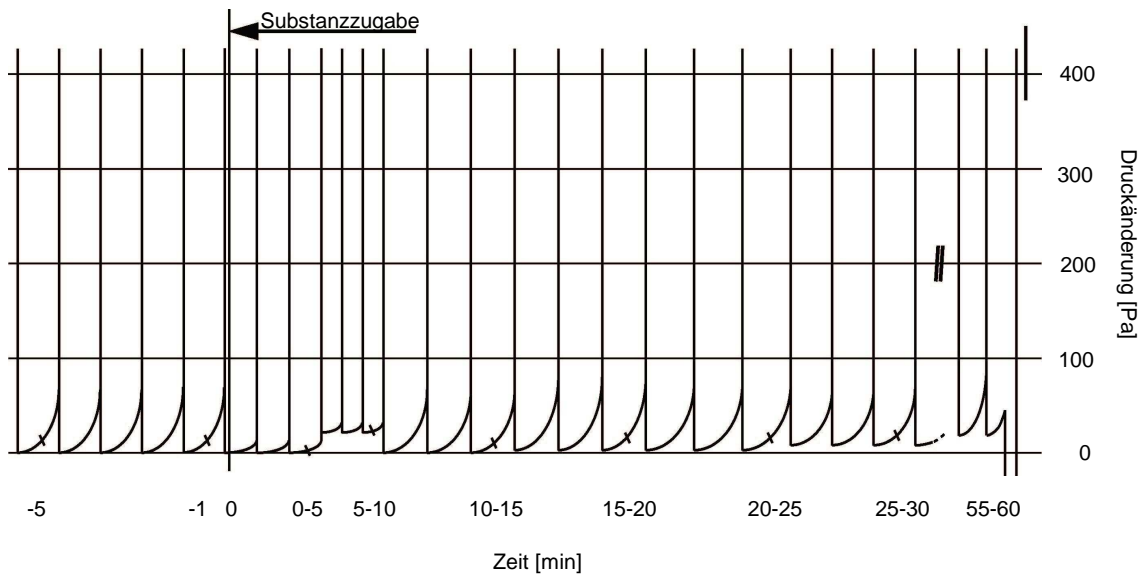
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Auswahl von Originalregistrierungen

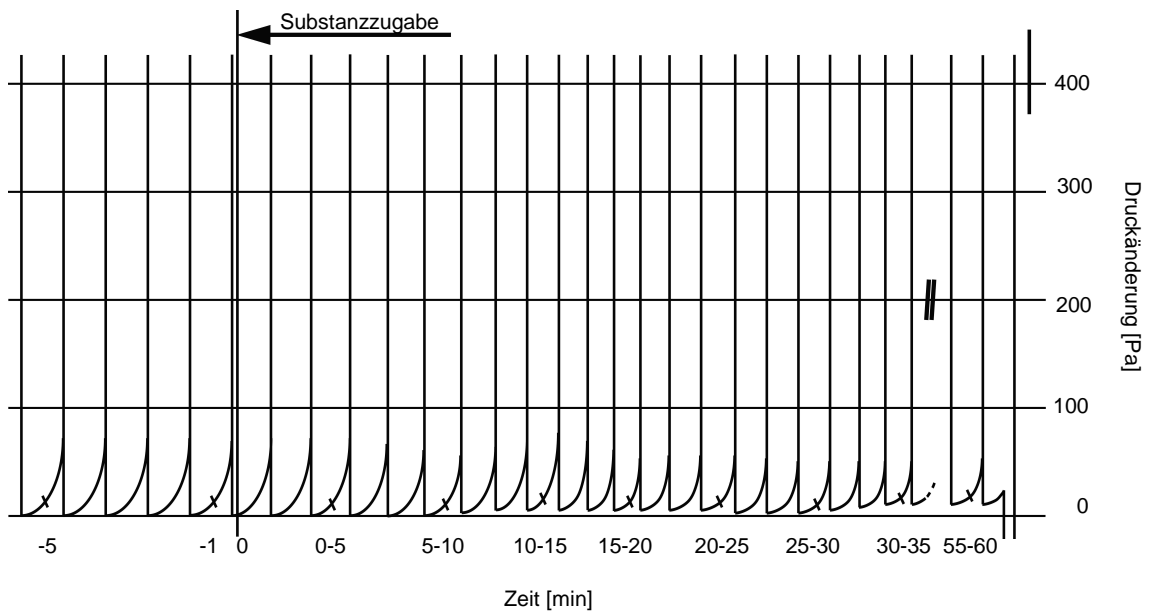
Nachfolgend sind Beispiele von Originalregistrierungen zu den Substanzen (r/h)-CRF 100 nM (**Abb. 4**), Urocortin II 100 nM (**Abb. 5**), Astressin 100 nM (**Abb. 6**), Astressin 100 nM in Kombination mit (r/h)-CRF 100 nM (**Abb. 7**) und die Kombination Tyrodelösung mit Midazolam 10 µM (**Abb. 8**) aufgeführt.



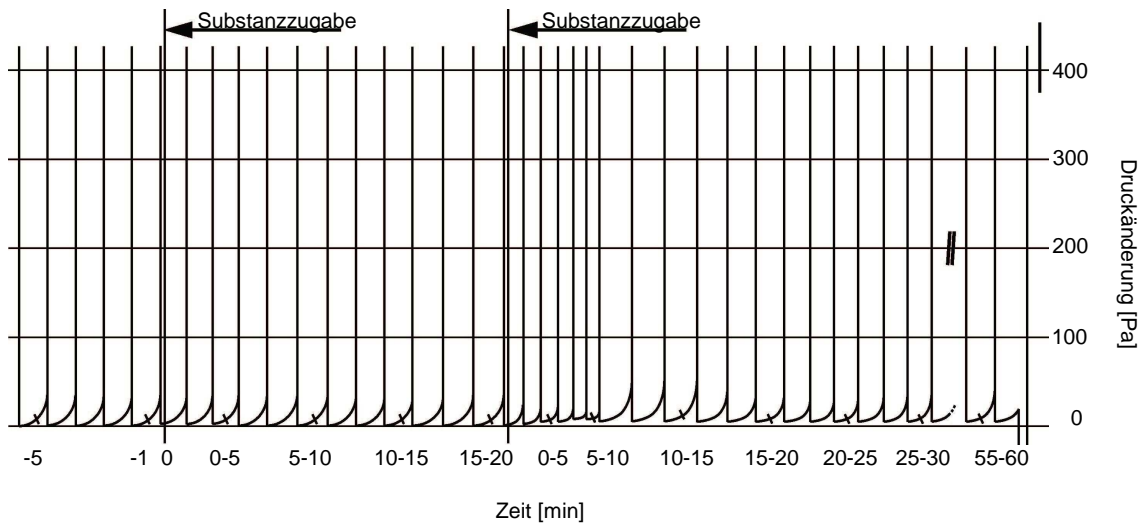
**Abb. 4: Originalregistrierung nach Applikation von (r/h)-CRF 100 nM**



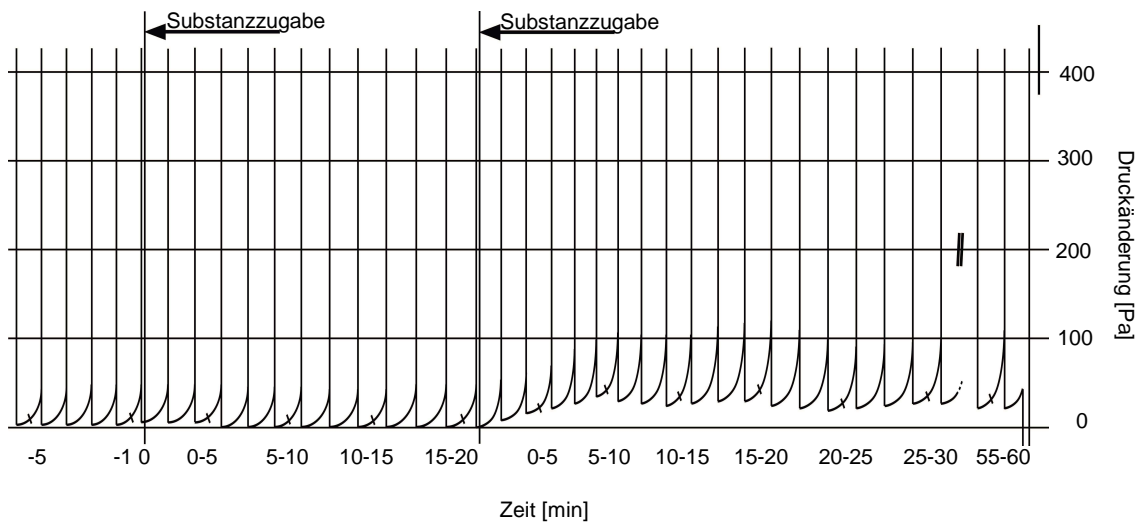
**Abb. 5: Originalregistrierung nach Applikation von Urocortin II 100 nM**



**Abb. 6: Originalregistrierung nach Applikation von Astressin 100 nM**



**Abb. 7: Originalregistrierung nach Applikation von Astressin und (r/h)-CRF jeweils 100 nM**



**Abb. 8: Originalregistrierung nach Applikation von Tyrodelösung und Midazolam 10  $\mu$ M**

### 3.2 Betrachtung der Agonisten

Im Folgenden werden die Ergebnisse für das  $\Delta$  PPT, das  $\Delta$  P<sub>Peak</sub>, die mittlere Latenz bis zum Peak und das  $\Delta$  PPT über 20 und 60 Minuten für (r/h)-CRF, Stressin und Urocortin II dargestellt. Wobei das  $\Delta$  PPT für den Punkt der maximalen Wandspannung und das  $\Delta$  P<sub>Peak</sub> für die stärkste Druckänderung

steht. Die mittlere Latenz bis zum Peak gibt den Zeitpunkt des  $\Delta P_{\text{Peak}}$  an. Eine mögliche Änderung der Peristaltik gibt das  $\Delta PPT$  nach 20 und 60 Minuten wider (**Kap. 2.3**).

In **Tab. 1** ist das  $\Delta P_{\text{Peak}}$ , dessen Standardfehler (SEM) und Signifikanzniveau nach Substanzgabe zu sehen. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass mit zunehmender Konzentration von (r/h)-CRF das  $\Delta P_{\text{Peak}}$  immer größere negative Werte annimmt. Je negativer diese Werte bezogen auf die Tyrodekontrolle, desto größer ist die Druckänderung im Dünndarmlumen. Je ausgeprägter die Druckänderung im Lumen, desto stärker die Zunahme der Peristaltik. Ein negativer  $\Delta P_{\text{Peak}}$ -Wert steht für eine Zunahme der Peristaltik in Relation zur Tyrodekontrolle. Umgekehrt steht ein positiver Wert für die Abnahme der Peristaltik. Signifikanz wird ab einer 10 nM-Konzentration erreicht.

**Tab. 1:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  nach (r/h)-CRF-Gabe**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg.	+ 0,87	± 2,14	
(r/h)-CRF 1 nM	- 8,40	± 3,93	0,060
(r/h)-CRF 10 nM	- 24,03	± 10,31	0,033
(r/h)-CRF 100 nM	- 30,22	± 8,40	0,003
(r/h)-CRF 300 nM	- 63,03	± 19,18	0,005

In **Tab. 2** ist die mittlere Latenz bis zum Erreichen des Peaks angegeben. Man würde erwarten, dass mit Zunahme der Peristaltik (negativer  $\Delta P_{\text{Peak}}$ ) die Latenz bis zum Erreichen des Peaks kleiner wird (in Relation zur Tyrodekontrolle). Jedoch gibt es keine dosisabhängige, signifikante Veränderung durch die Zugabe von (r/h)-CRF (**Tab. 2**).

**Tab. 2: Mittlere Latenz bis zum Peak nach (r/h)-CRF-Gabe**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg.	+ 9,38	± 2,40	
(r/h)-CRF 1 nM	+ 18,75	± 3,63	0,049
(r/h)-CRF 10 nM	+ 13,75	± 4,41	0,398
(r/h)-CRF 100 nM	+ 9,38	± 3,71	1,000
(r/h)-CRF 300 nM	+ 9,38	± 1,99	1,000

Wie bei (r/h)-CRF kann man auch bei Stressin und Urocortin II eine konzentrationsabhängige Zunahme der Negativität des  $\Delta P_{\text{Peak}}$ , d.h. der Peristaltik feststellen (**Tab. 3** und **Tab. 4**). Signifikanz ( $p < 0,02$ ) wird für Stressin ab 10 nM und für Urocortin II ab 1 nM erreicht. Zwischen der Wirkung der 1 nM- und 10 nM-Konzentration des Urocortin II gibt es keinen dosisabhängigen Unterschied.

Analog zum  $\Delta P_{\text{Peak}}$  nimmt die mittlere Latenz bis zum Peak von 1 nM bis 100 nM kontinuierlich ab, eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ) besteht nur für Stressin 30 nM (**Tab. 5** und **Tab. 6**).

**Tab. 3:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  nach Stressingabe**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg.	- 3,32	$\pm 2,28$	
Stressin 1 nM	- 13,10	$\pm 5,64$	0,130
Stressin 10 nM	- 20,84	$\pm 5,38$	0,010
Stressin 30 nM	- 29,70	$\pm 7,13$	0,003
Stressin 100 nM	- 26,36	$\pm 7,00$	0,007

**Tab. 4:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  nach Urocortin-II-Gabe**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg.	- 1,89	$\pm 2,26$	
Urocortin II 1 nM	- 27,00	$\pm 8,63$	0,014
Urocortin II 10 nM	- 25,23	$\pm 4,07$	0,0002
Urocortin II 100 nM	- 41,68	$\pm 12,95$	0,009

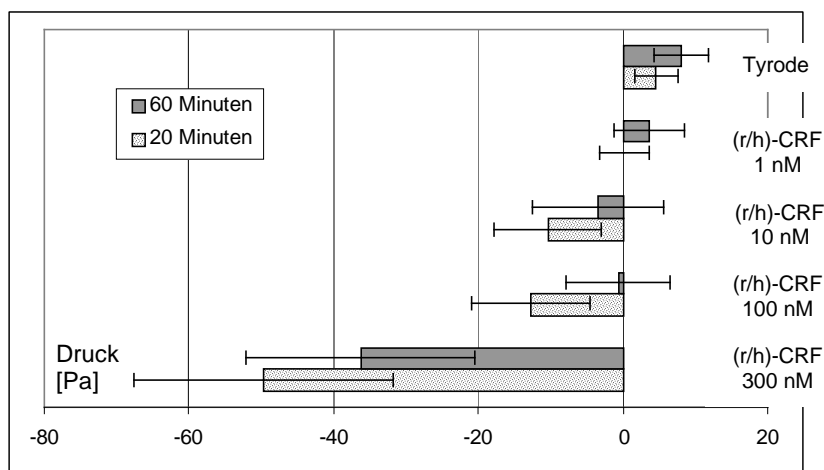
**Tab. 5: Mittlere Latenz bis zum Peak nach Stressingabe**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg.	+ 23,75	$\pm 7,60$	
Stressin 1 nM	+ 23,13	$\pm 6,47$	0,951
Stressin 10 nM	+ 18,74	$\pm 6,73$	0,630
Stressin 30 nM	+ 6,88	$\pm 1,32$	0,046
Stressin 100 nM	+ 15,00	$\pm 4,23$	0,332

**Tab. 6: Mittlere Latenz bis zum Peak nach Urocortin-II-Gabe**

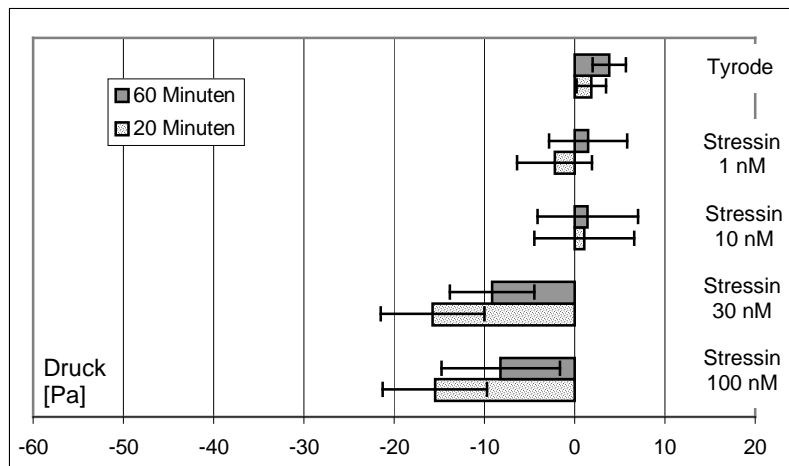
Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg.	+ 31,88	± 8,96	
Urocortin II 1 nM	+ 20,63	± 4,67	0,284
Urocortin II 10 nM	+ 16,88	± 5,50	0,176
Urocortin II 100 nM	+ 18,13	± 7,25	0,253

Das  $\Delta$  PPT nach 20 und 60 Minuten spiegelt die Druckänderung im Dünndarm-lumen im zeitlichen Verlauf wider (**Abb. 9**). Da es gegen Ende des gemessenen Zeitintervalls von 60 Minuten physiologisch zu einem leichten Anstieg der Peristaltik kommt, sollte ein signifikanter Effekt auf die Peristaltik innerhalb der ersten 20 Minuten detektiert werden. Der physiologische Verlauf wird in der Tyrodekontrolle dargestellt (**Abb. 9**). Für alle (r/h)-CRF-Konzentrationen gilt, dass der 20 Minutenwert größer ist als der nach 60 Minuten. Man könnte eine konzentrationsabhängige Wirkung des (r/h)-CRFs auf die Peristaltik postulieren. Dieser Effekt ist jedoch erst ab 10 nM für  $p < 0,08$  signifikant.

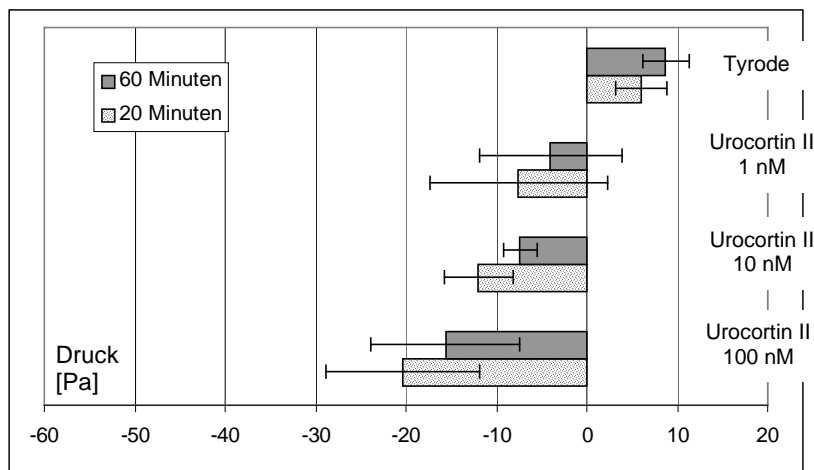


**Abb. 9:  $\Delta$  PPT nach 20 Minuten und 60 Minuten nach (r/h)-CRF-Gabe**

Für Stressin und Urocortin II gilt analog zu (r/h)-CRF, dass eine Veränderung der Peristaltik nach 20 Minuten eintritt, da das  $\Delta$  PPT nach 20 Minuten größer ist als nach 60 Minuten. Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wird für die 30 nM- und 100 nM-Konzentration des Stressins sowie für die 10 nM- und 100 nM-Konzentration des Urocortin II erreicht (**Abb. 10** und **Abb. 11**).



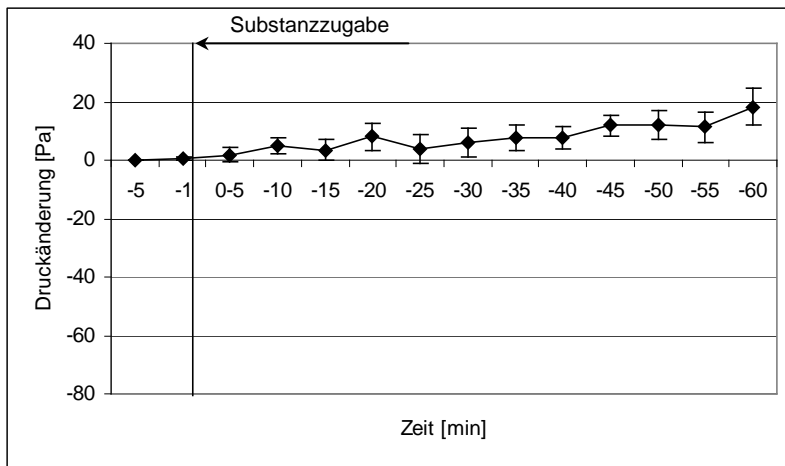
**Abb. 10:  $\Delta$  PPT nach 20 Minuten und 60 Minuten nach Stressingabe**



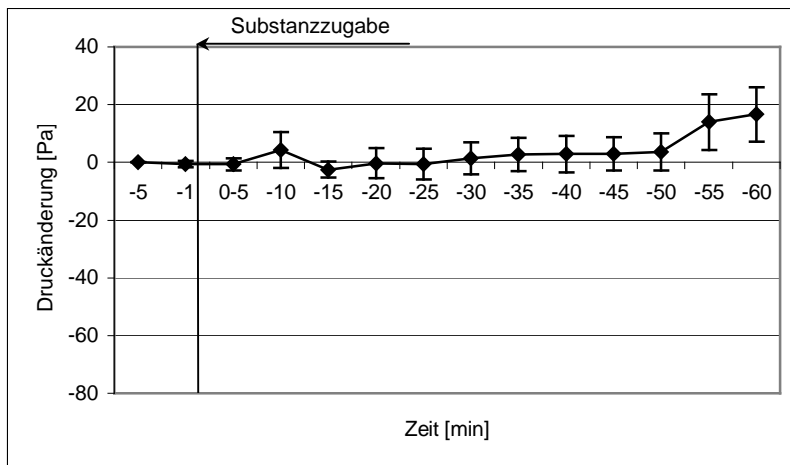
**Abb. 11:  $\Delta$  PPT nach 20 Minuten und 60 Minuten nach Urocortin-II-Gabe**

Der physiologische Verlauf des Schwellendrucks ( $\Delta$  PPT) wird durch die Tyrodekontrolle widergegeben (**Abb. 12**, **Abb. 55** und **Abb. 56**). Hier kommt es zu einem kontinuierlichen und langsamen Anstieg des  $\Delta$  PPT. Ähnlich verläuft die Kurve von (r/h)-CRF 1 nM (**Abb. 13**). Folglich kommt es bei einer Zugabe von 1 nM-(r/h)-CRF zu keiner Wirkung auf die Peristaltik.



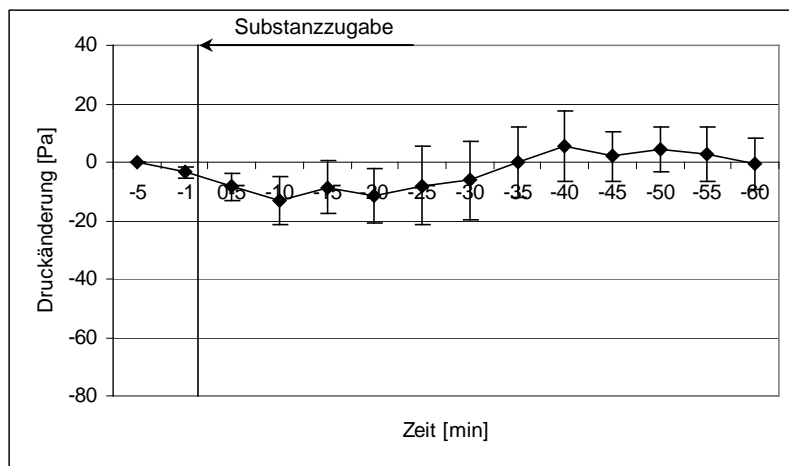


**Abb. 12:  $\Delta$  PPT der Tyrodelösung zur (r/h)-CRF-Versuchsreihe**



**Abb. 13:  $\Delta$  PPT nach Applikation von (r/h)-CRF 1 nM**

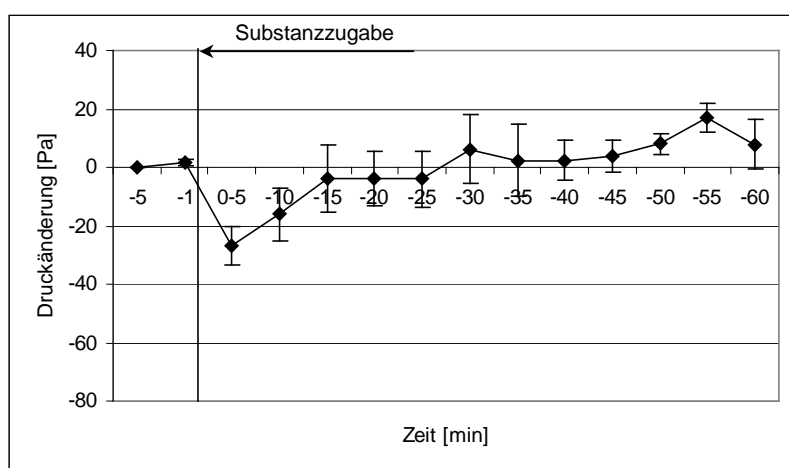
In **Abb. 14**, **Abb. 15** und **Abb. 16** wird das  $\Delta$  PPT für die jeweilige (r/h)-CRF-Konzentration dargestellt. Hier sieht man, dass mit deren Zunahme das  $\Delta$  PPT negativer wird und entsprechend die Reaktion des Ileums früher und stärker einsetzt.



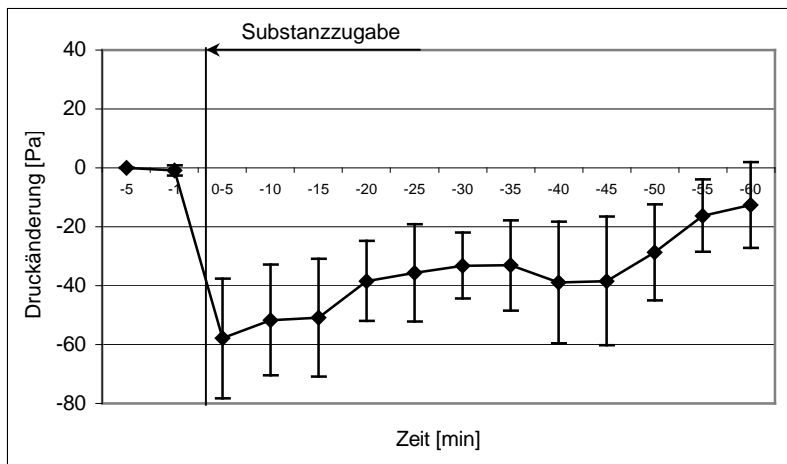
**Abb. 14:  $\Delta$  PPT nach Applikation von (r/h)-CRF 10 nM**

Dies gilt auch für die  $\Delta$  PPT-Kurvenverläufe von Stressin und Urocortin II (**Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21, Abb. 22** und **Abb. 23**). Mit Zunahme der Substanzkonzentration kommt es zu einer Zunahme der Peristaltik. Ausnahme ist die 30 nM-Konzentration des Stressins (**Abb. 19**). Sie zeigt die ausgeprägteste Peristaltikzunahme innerhalb der Stressinreihe. Eine weitere Ausnahme stellen die 1 nM- und 10 nM-Konzentration von Urocortin II dar. Hier gibt es ebenfalls keinen dosisabhängigen Effekt (**Abb. 21** und **Abb. 22**).

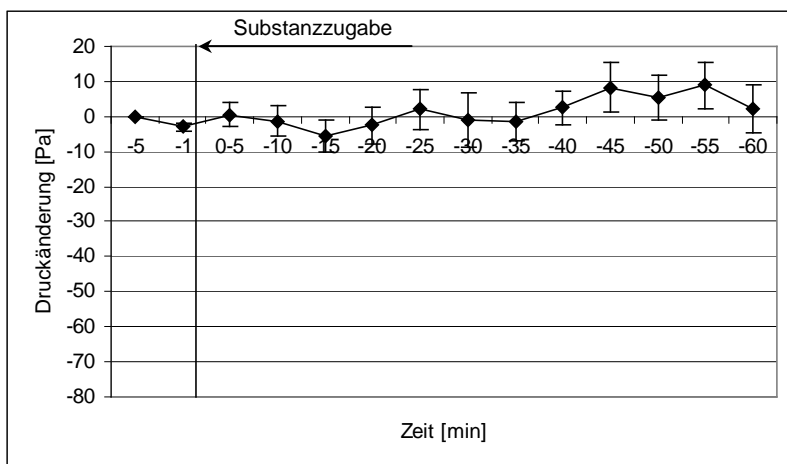
Vergleicht man die  $\Delta$  PPT-Kurven der Agonisten in höheren Konzentrationen, stellt man fest, dass sie sich im Verlauf ähneln (**Abb. 24**).



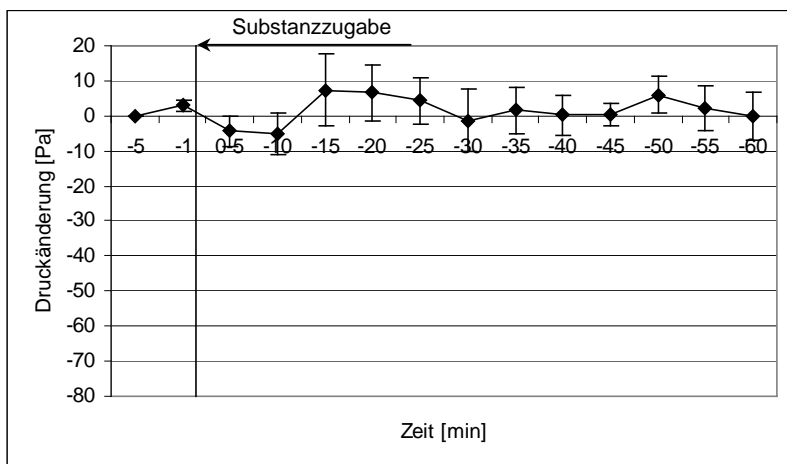
**Abb. 15:  $\Delta$  PPT nach Applikation von (r/h)-CRF 100 nM**



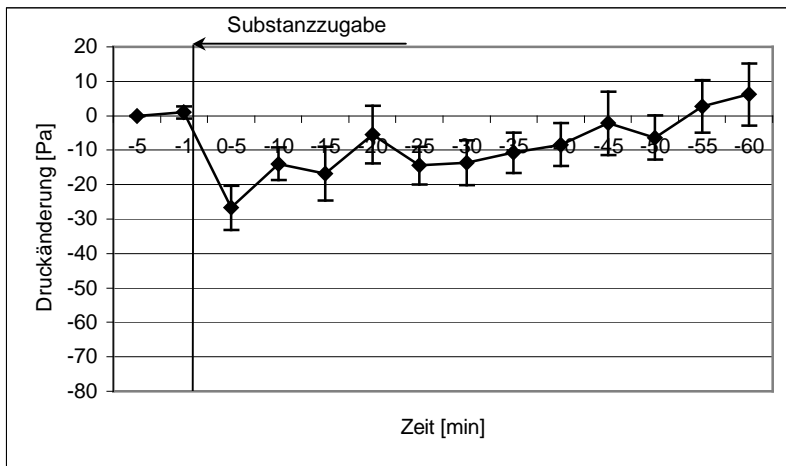
**Abb. 16:  $\Delta$  PPT nach Applikation von (r/h)-CRF 300 nM**



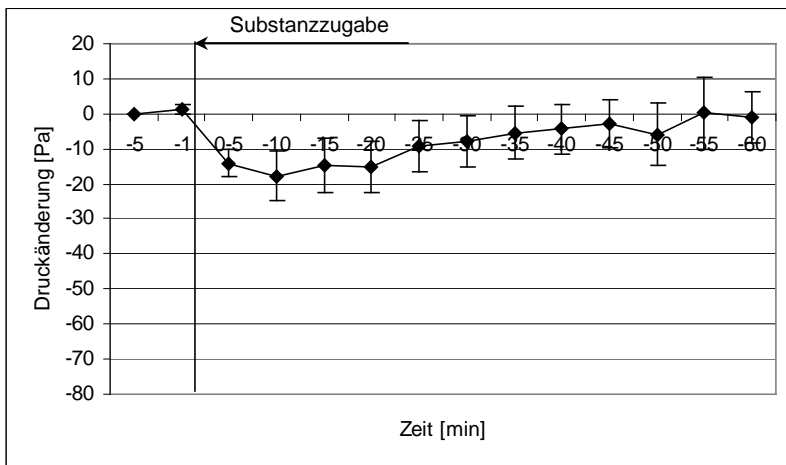
**Abb. 17:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Stressin 1nM**



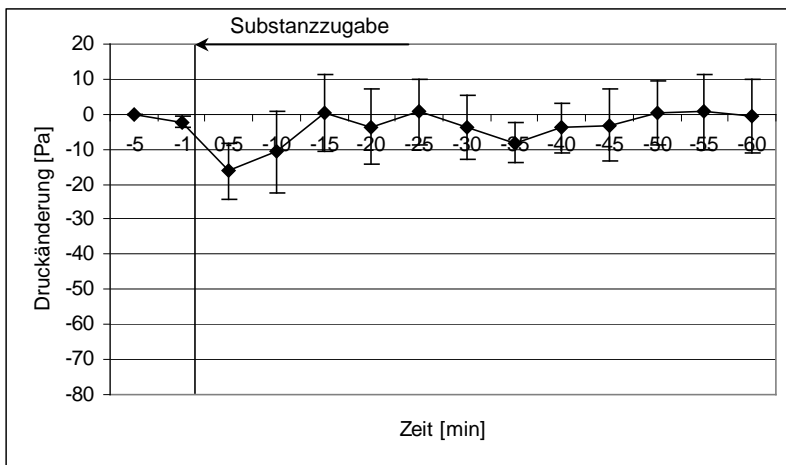
**Abb. 18:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Stressin 10 nM**



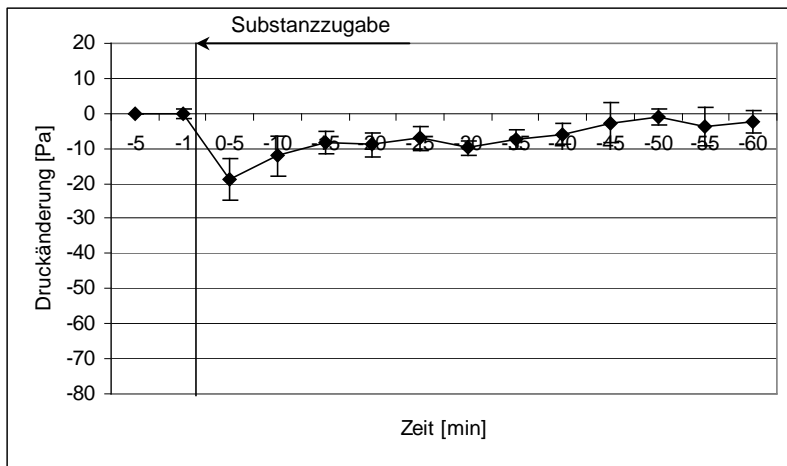
**Abb. 19:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Stressin 30 nM**



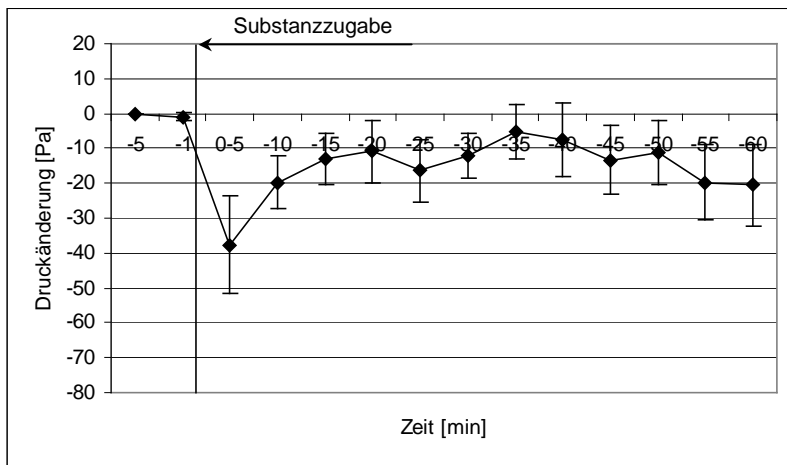
**Abb. 20:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Stressin 100 nM**



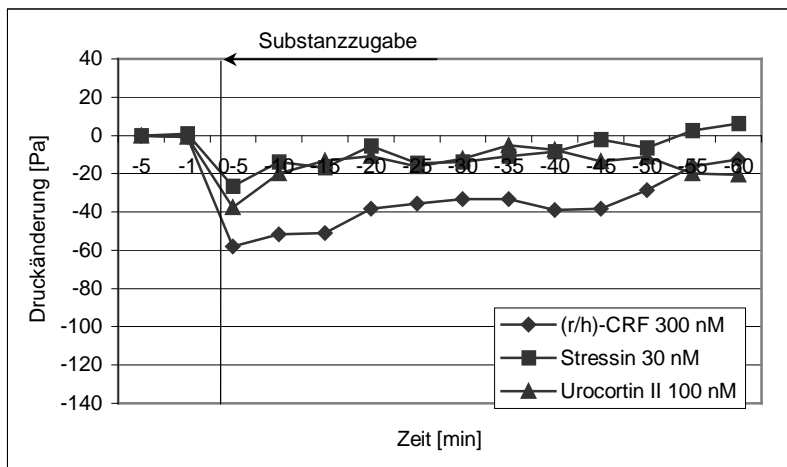
**Abb. 21:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Urocortin II 1 nM**



**Abb. 22: Δ PPT nach Applikation von Urocortin II 10 nM**



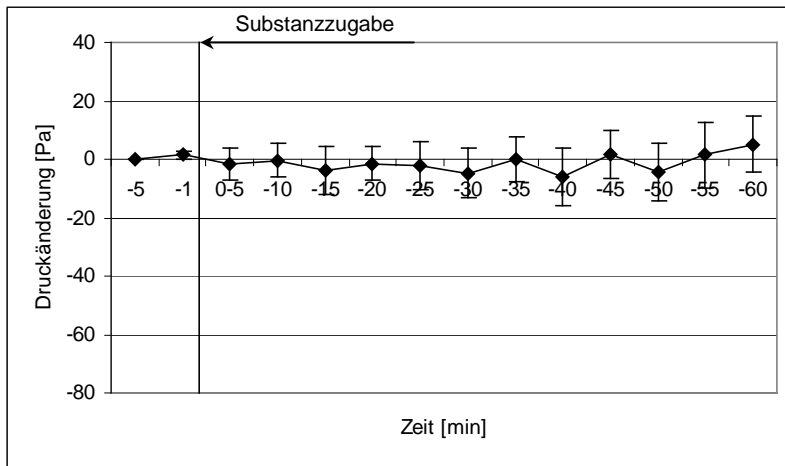
**Abb. 23: Δ PPT nach Applikation von Urocortin II 100 nM**



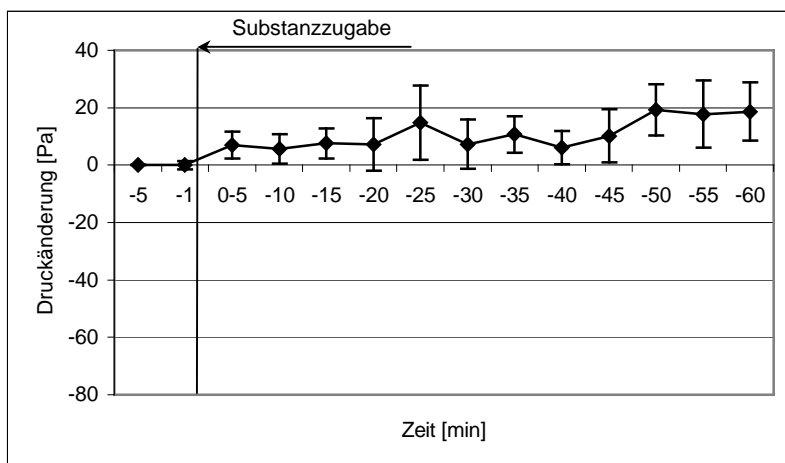
**Abb. 24: Δ PPT von (r/h)-CRF 300 nM, Stressin 30 nM, Urocortin II 100 nM**

### 3.3 Betrachtung der Antagonisten

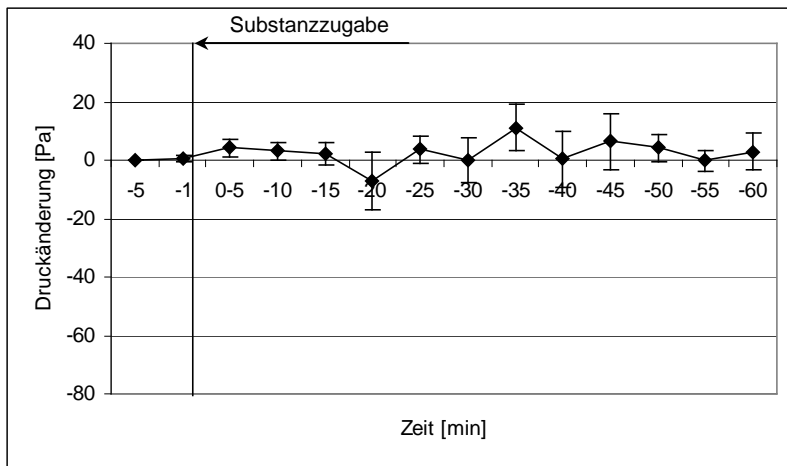
Bei den Antagonisten Astressin, NBI 27914 und K 41498 ist keine Wirkung auf das  $\Delta$  PPT und damit auf die Peristaltik nachweisbar. Einzige Ausnahme stellt NBI 27914 in der Konzentration 100 nM dar (**Abb. 30**). Nach Substanzzugabe kommt es zu einem langsamen, progredienten Kurvenanstieg, welcher stärker ausgeprägt ist als der physiologische Peristaltikanstieg einer Tyrodekontrolle und zusätzlich eine hohe SEM aufweist. Die Kurvenverläufe zu Astressin, K 41498 und NBI 27914 für 1 nM, 10 nM und 100 nM sind im Folgenden dargestellt.



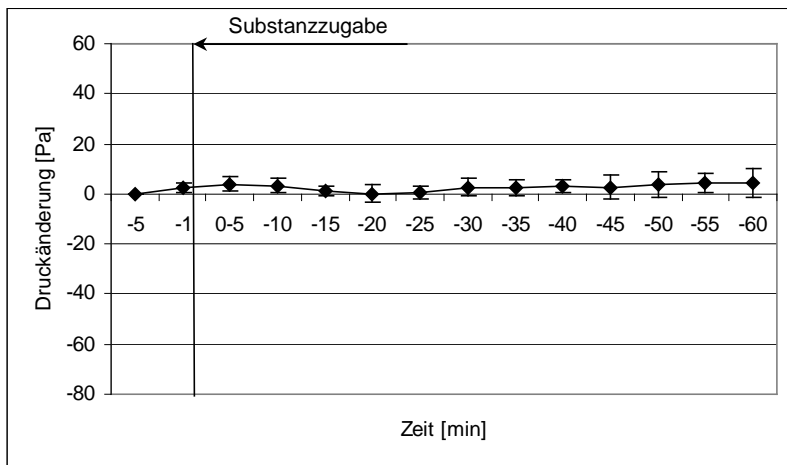
**Abb. 25:**  $\Delta$  PPT nach Applikation von Astressin 1 nM



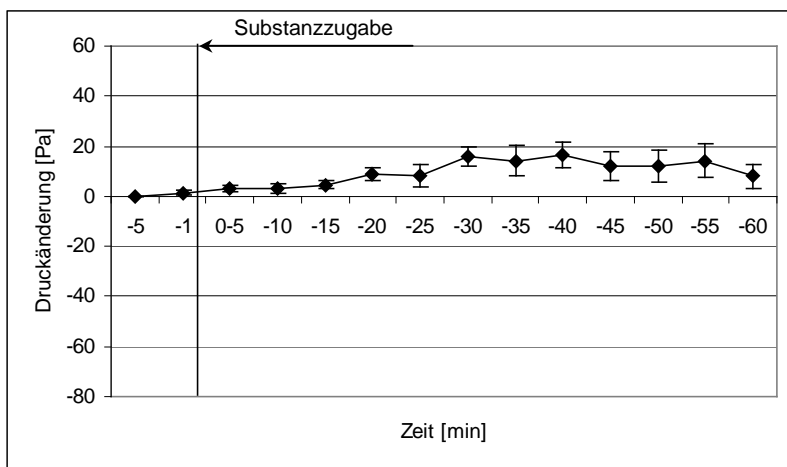
**Abb. 26:**  $\Delta$  PPT nach Applikation von Astressin 10 nM



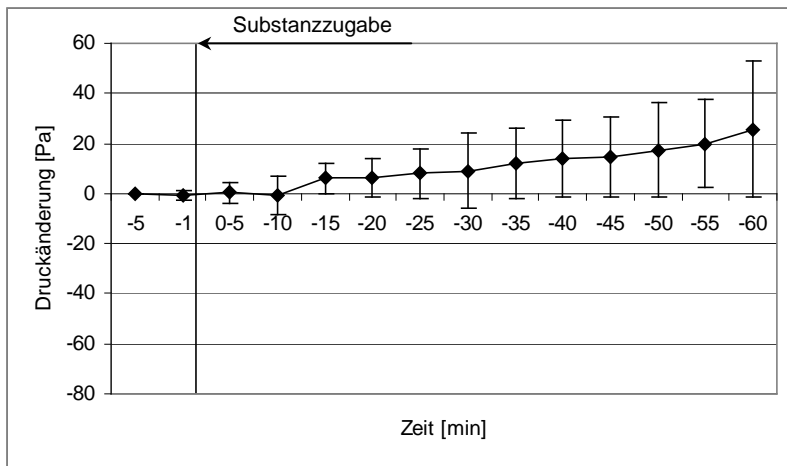
**Abb. 27:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Astressin 100 nM**



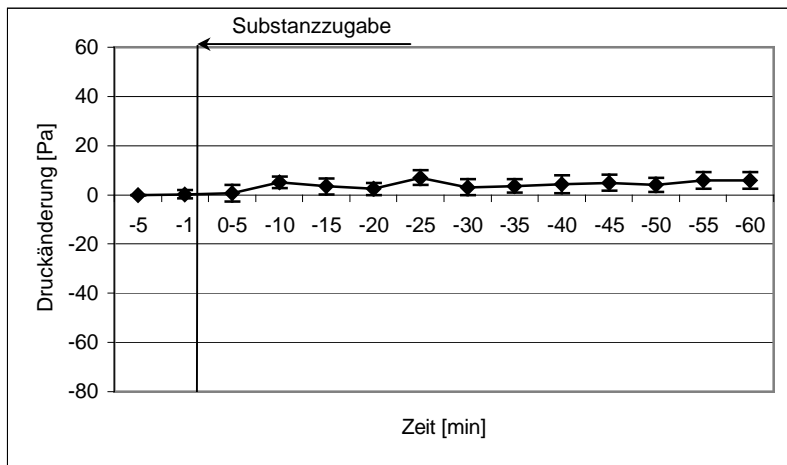
**Abb. 28:  $\Delta$  PPT nach Applikation von NBI 27914 1 nM**



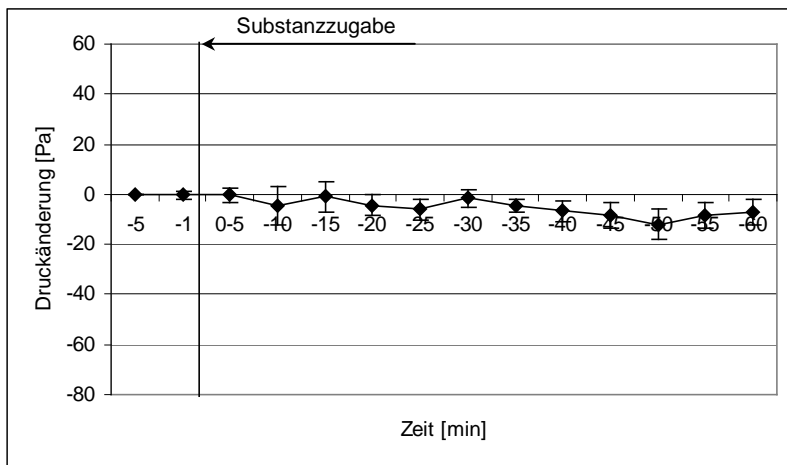
**Abb. 29:  $\Delta$  PPT nach Applikation von NBI 27914 10 nM**



**Abb. 30:  $\Delta$  PPT nach Applikation von NBI 27914 100 nM**

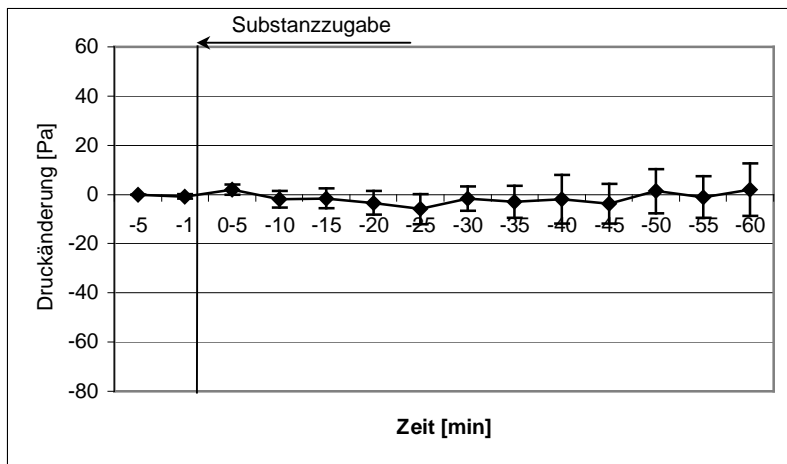


**Abb. 31:  $\Delta$  PPT nach Applikation von K 41498 1 nM**



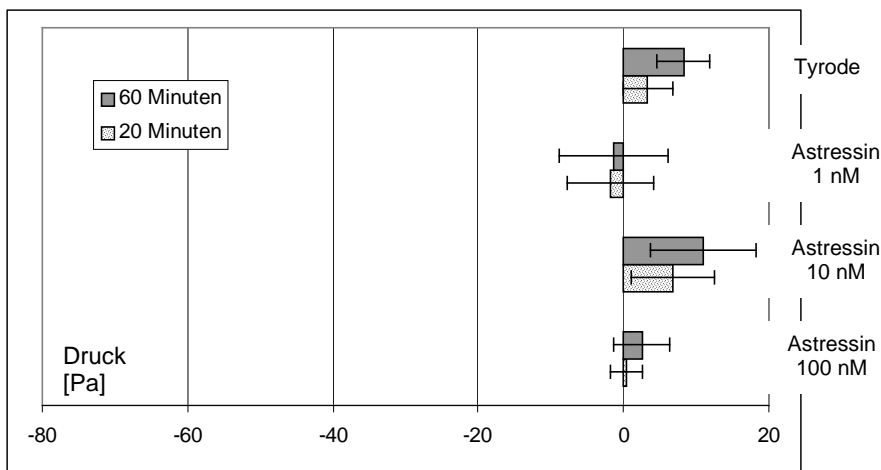
**Abb. 32:  $\Delta$  PPT nach Applikation von K 41498 10 nM**



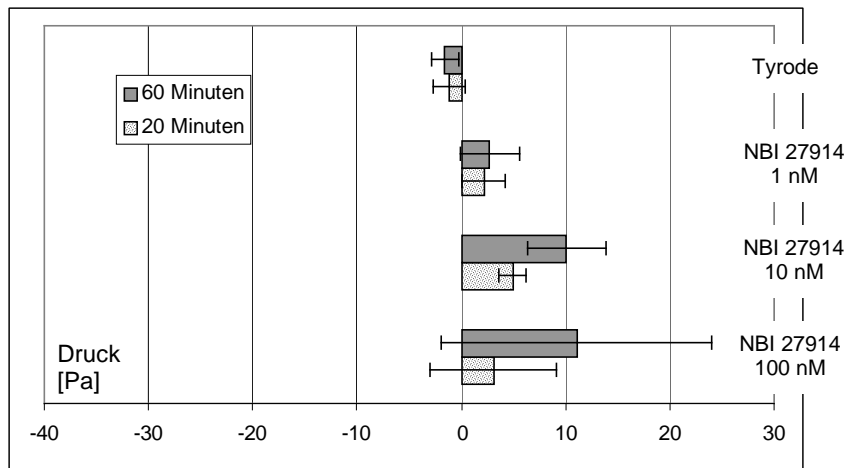


**Abb. 33:  $\Delta$  PPT nach Applikation von K 41498 100 nM**

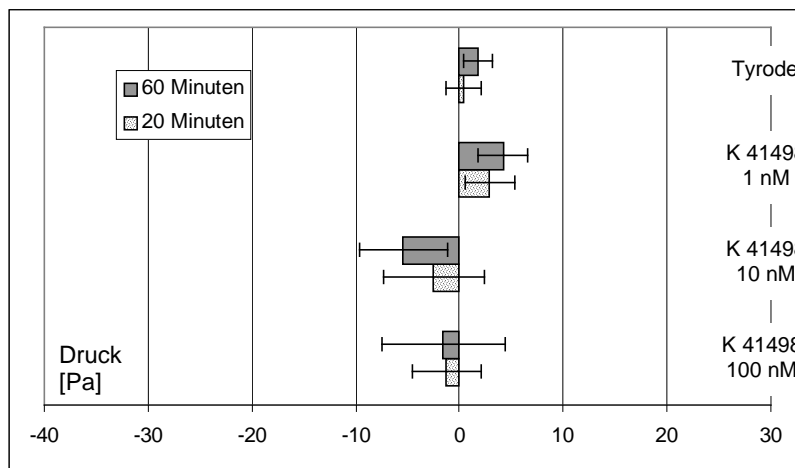
Betrachtet man das  $\Delta$  PPT über die Zeit für Astressin, NBI 27914 und K 41498 bleibt nach Substanzzugabe der 20 Minutenwert kleiner als der nach 60 Minuten. Das  $\Delta$  PPT über die Zeit verhält sich ähnlich wie das der Tyrodekontrolle; es gibt keine Veränderung der Peristaltik nach der Applikation des jeweiligen Antagonisten (**Abb. 34, Abb. 35 und Abb. 36**).



**Abb. 34:  $\Delta$  PPT nach 20 Minuten und 60 Minuten nach Astressingabe**



**Abb. 35:  $\Delta$  PPT nach 20 Minuten und 60 Minuten nach NBI 27914-Gabe**



**Abb. 36:  $\Delta$  PPT nach 20 Minuten und 60 Minuten nach K 41498-Gabe**

### 3.4 Betrachtung der Wechselwirkung zwischen Antagonisten und Agonisten

Nachdem die Agonisten in der 100 nM-Konzentration eine Zunahme der Peristaltik induzieren und die Antagonisten erwartungsgemäß keine Veränderung der Ileummotilität hervorrufen, wird nun die Interaktion von Antagonisten und Agonisten am Ileum untersucht. Ziel ist es herauszufinden, ob die Antagonisten den stimulatorischen Effekt der Agonisten verhindern können.

Es werden die unselektiven Substanzen Astressin und (r/h)-CRF sowie die selektiven Substanzen für CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren (NBI 27914 und Stressin) und die selektiven Substanzen für CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren (K 41498 und Urocortin II) untersucht.

Die  $\Delta P_{\text{Peak}}$  für Astressin und (r/h)-CRF, NBI 27914 und Stressin sowie K 41498 und Urocortin II zeigen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Tyrodekontrollkombination (**Tab. 7**, **Tab. 8** und **Tab. 9**).

**Tab. 7:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  der Kombination Astressin und (r/h)-CRF**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und (r/h)-CRF 100 nM	- 33,79	± 12,31	
Astressin 100 nM und (r/h)-CRF 100 nM	- 29,22	± 11,18	0,788

**Tab. 8:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  der Kombination NBI 27914 und Stressin**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Stressin 100 nM	- 30,63	± 7,54	
NBI 27914 100 nM und Stressin 100 nM	- 29,36	± 8,51	0,913

**Tab. 9:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  der Kombination K 41498 und Urocortin II**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Urocortin II 100 nM	- 20,36	± 6,86	
K 41498 100 nM und Urocortin II 100 nM	- 18,98	± 7,50	0,894

Betrachtet man die mittlere Latenz bis zum Peak aller Kombinationen ergibt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zur jeweiligen Tyrodekontrollkombination (**Tab. 10**, **Tab. 11** und **Tab. 12**).

**Tab. 10: Mittlere Latenz bis zum Peak der Kombination Astressin und (r/h)-CRF**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und (r/h)-CRF 100 nM	+ 12,50	± 3,54	
Astressin 100 nM und (r/h)-CRF 100 nM	+ 8,75	± 2,45	0,398

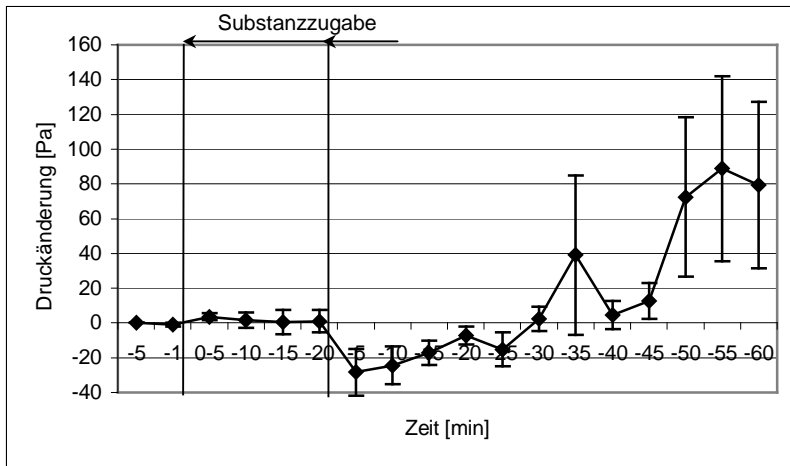
**Tab. 11: Mittlere Latenz bis zum Peak der Kombination NBI 27914 und Stressin**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Stressin 100 nM	+ 15,63	± 5,38	
NBI 27914 100 nM und Stressin 100 nM	+ 19,38	± 5,30	0,627

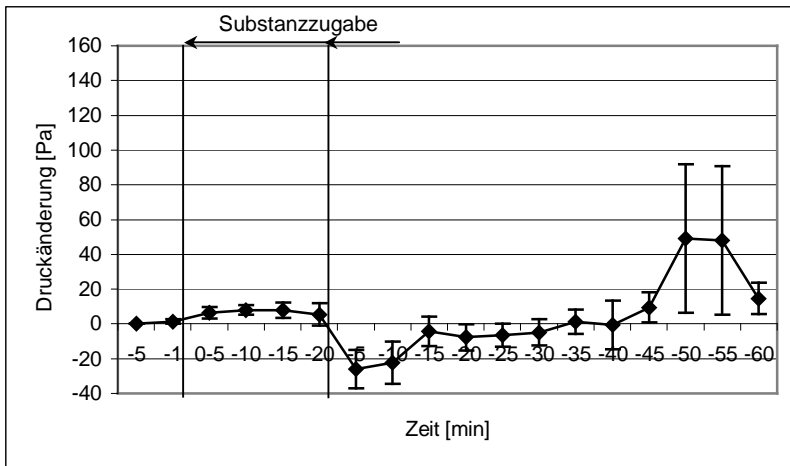
**Tab. 12: Mittlere Latenz bis zum Peak der Kombination K 41498 und Urocortin II**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Urocortin II 100 nM	+ 11,25	± 4,09	
K 41498 100 nM und Urocortin II 100 nM	+ 13,75	± 4,41	0,684

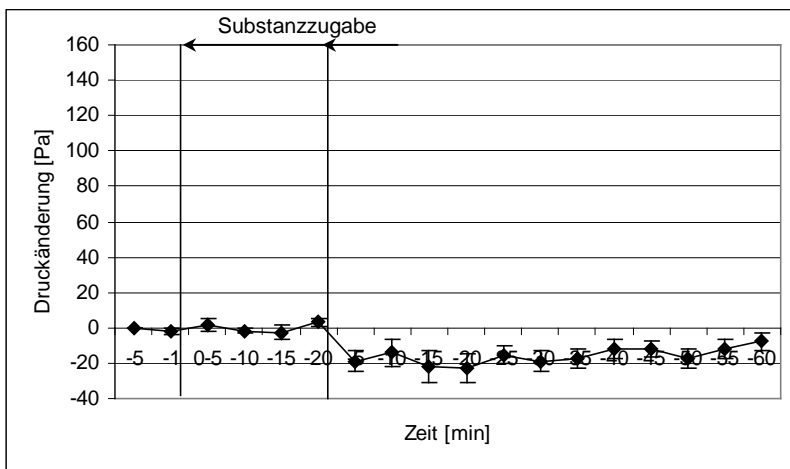
Das  $\Delta$  PPT (**Abb. 37** und **Abb. 38**) zeigt nach Vorbehandlung mit Astressin im Vergleich zur Tyrodekontrolle keine wesentliche intraluminale Druckänderung. Dies gilt auch für die Kombinationen der CRF<sub>1</sub>-selektiven (**Abb. 39** und **Abb. 40**) und CRF<sub>2</sub>-selektiven Substanzen (**Abb. 41** und **Abb. 42**).



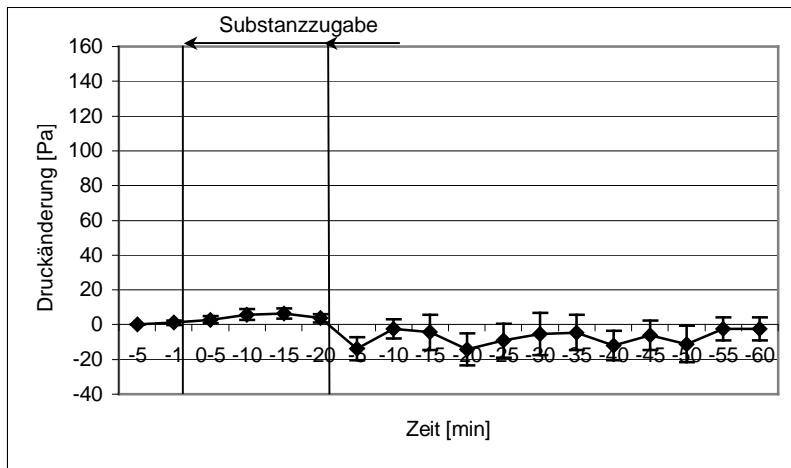
**Abb. 37:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Tyrodelösung + (r/h)-CRF 100 nM**



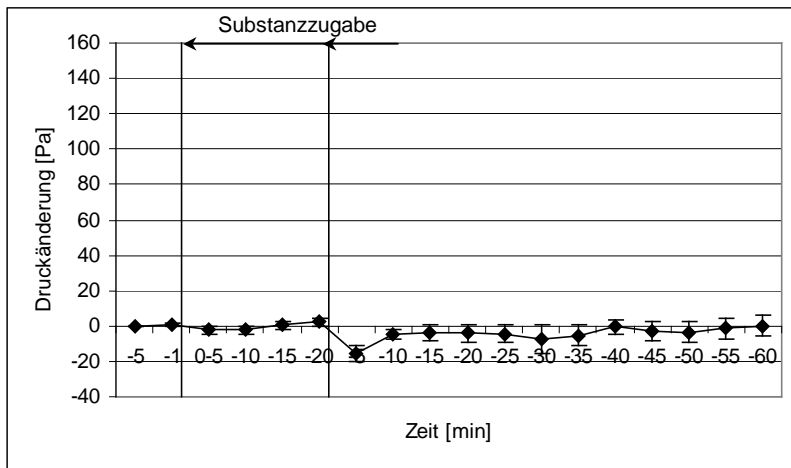
**Abb. 38:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Astressin 100 nM + (r/h)-CRF 100 nM**



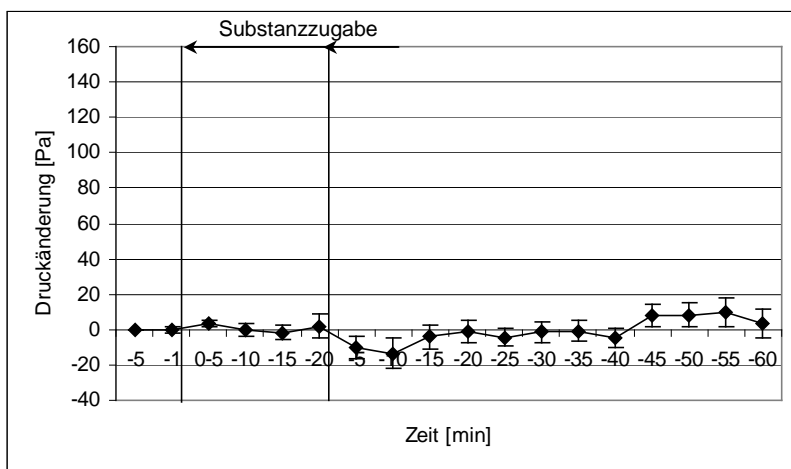
**Abb. 39:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Tyrodelösung + Stressin 100 nM**



**Abb. 40:  $\Delta$  PPT nach Applikation von NBI 27914 100 nM + Stressin 100 nM**

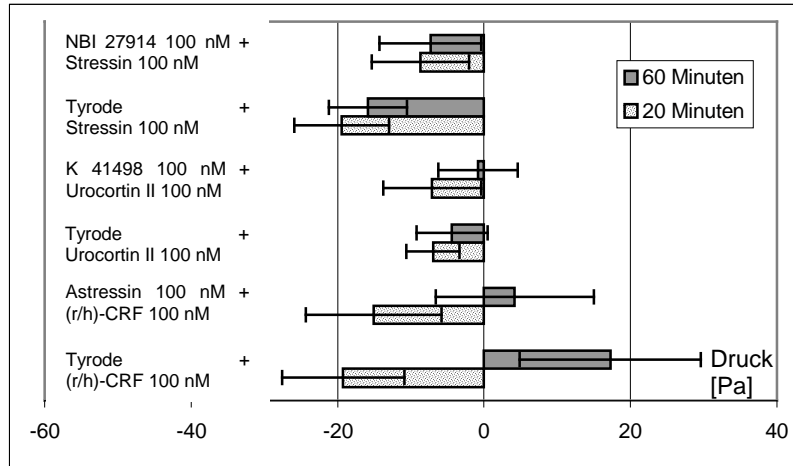


**Abb. 41:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Tyrodelösung + Urocortin II 100 nM**



**Abb. 42:  $\Delta$  PPT nach Applikation von K 41498 100 nM + Urocortin II 100 nM**

Das  $\Delta$  PPT über die Zeit aller Kombinationen ist in **Abb. 43** dargestellt. Es ergibt sich für keine Kombination ein signifikanter Effekt ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur jeweiligen Tyrodekontrollkombination.



**Abb. 43:  $\Delta$  PPT nach 20 und 60 Minuten nach Applikation der Kombination aus Antagonist oder Tyrodelösung mit dem jeweiligen Agonisten**

Insgesamt konnte weder das  $\Delta P_{Peak}$ , die mittlere Latenz bis zum Peak noch das  $\Delta$  PPT über die Zeit oder das  $\Delta$  PPT durch die Vorbehandlung des Ileums mit einem Antagonisten beeinflusst werden. Somit ist es nicht gelungen, die stimulatorische Wirkung von (r/h)-CRF, Stressin und Urocortin II durch die Vorbehandlung des Ileums mit Astressin, NBI 27914 oder K 41498 zu modulieren.

### 3.5 Betrachtung der Wechselwirkung mit Midazolam

In einer vorangegangenen Dissertation (Wenderoth, 2002) wurde die inhibitorische Wirkung von Midazolam auf die Dünndarmperistaltik untersucht.

Im Folgenden werden die Beobachtungen auf die bekannten Größen  $\Delta P_{Peak}$ , mittlere Latenz bis zum Peak,  $\Delta$  PPT nach 20 und 60 Minuten und  $\Delta$  PPT dargestellt. Eine Interpretation der Ergebnisse wird aufgrund der Komplexität Gegenstand der Diskussion sein.

### 3.5.1 Die unselektiven Substanzen

In den beiden **Tab. 13** und **Tab. 14** sind das  $\Delta P_{\text{Peak}}$  und die mittlere Latenz bis zum Erreichen des Peaks für die Kombinationen Midazolam mit (r/h)-CRF oder Astressin aufgelistet. Das kleinste  $\Delta P_{\text{Peak}}$  hat die Kombination Astressin und Midazolam. Das Größte wird durch (r/h)-CRF 1 nM und Midazolam hervorgerufen. Die Kombination (r/h)-CRF 10 nM und Midazolam zeigt im Vergleich zur Tyrodekontrolle keine Reaktion. Die Einordnung dieses Phänomens ist unklar.

**Tab. 13:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  der Kombination Midazolam mit (r/h)-CRF od. Astressin**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 172,44	$\pm$ 28,71	
(r/h)-CRF 1 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 216,05	$\pm$ 36,95	0,367
(r/h)-CRF 10 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 174,91	$\pm$ 46,95	0,965
Astressin 100 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 101,74	$\pm$ 13,89	0,044

Die Vorbehandlung des Ileums mit (r/h)-CRF oder Astressin ruft für keine der Substanzen / Konzentrationen eine signifikante Änderung der mittleren Latenz hervor (**Tab. 14**).

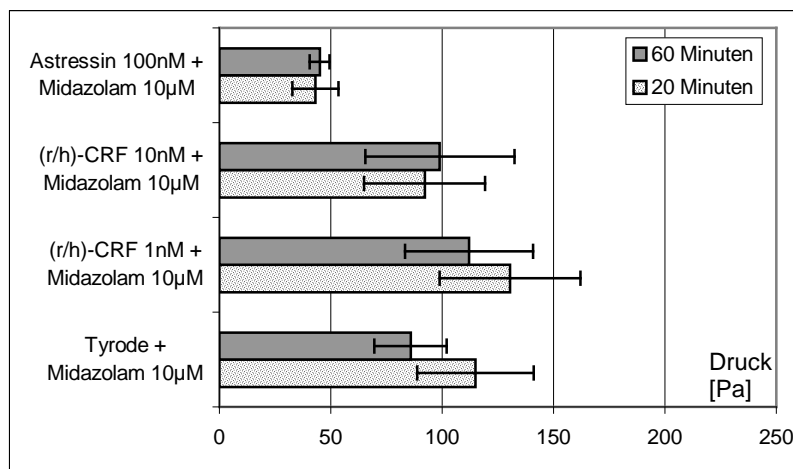
**Tab. 14: Mittlere Latenz bis zum Peak der Kombination Midazolam mit (r/h)-CRF od. Astressin**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 20,63	$\pm$ 5,13	
(r/h)-CRF 1 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 18,75	$\pm$ 4,09	0,779
(r/h)-CRF 10 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 23,13	$\pm$ 4,53	0,720
Astressin 100 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 34,38	$\pm$ 8,47	0,187

Betrachtet man das  $\Delta PPT$  über 20 und 60 Minuten, so fällt auf, dass die Kombination Astressin und Midazolam ein signifikantes niedrigeres  $\Delta PPT$

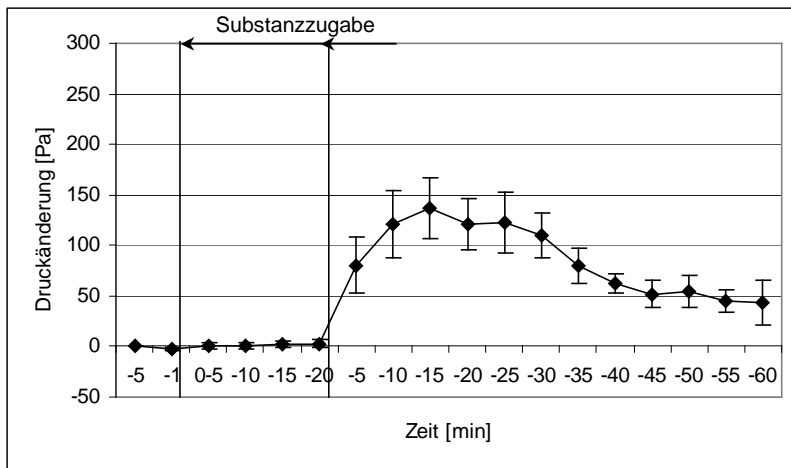


gegenüber der Kombination Tyrodelösung und Midazolam hat (**Abb. 44**), während (r/h)-CRF und Midazolam sich nicht wesentlich von der Tyrodekontrolle unterscheiden (**Abb. 44**). Dies wurde nicht erwartet. Ein hohes positives  $\Delta$  PPT steht für eine inhibitorische Wirkung, wie z.B. die des Midazolams. Eine Zugabe von Astressin, eines unselektiven Antagonisten, welcher als „Anti-Stress-Substanz“ verstanden wird, sollte die Peristaltik nicht stimulieren und so in Summe den inhibitorischen Effekt des Midazolams reduzieren. Idealerweise sollte Astressin wie in **Kap. 3.3** gezeigt keinen Effekt auf die Peristaltik haben.

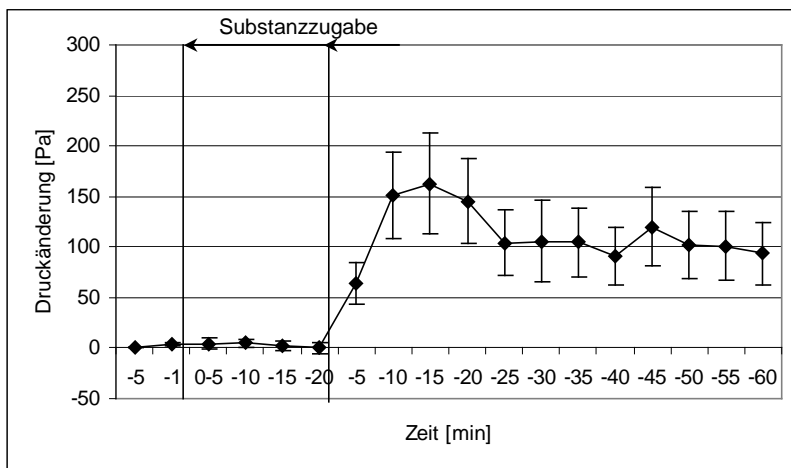


**Abb. 44:  $\Delta$  PPT nach 20 und 60 Minuten nach Applikation der nicht-selektiven Substanzen und Midazolam**

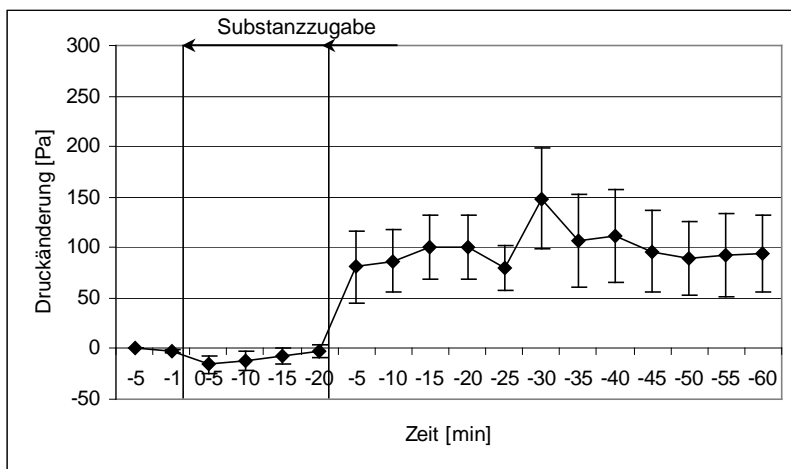
Wie bereits bei  $\Delta P_{Peak}$  und  $\Delta$  PPT über die Zeit beobachtet wurde, löst die Kombination von Astressin mit Midazolam in Summe eine deutliche Zunahme der Peristaltik aus (**Abb. 48**). Das  $\Delta$  PPT zeigt ebenfalls niedrige Werte im Vergleich zur Tyrodekontrolle. Am stärksten steigt das  $\Delta$  PPT des Schwellendrucks bei der Kombination von (r/h)-CRF 1 nM und Midazolam an (**Abb. 46**). (r/h)-CRF 1 nM verstärkt somit die inhibitorische Wirkung des Midazolams. Eine Steigerung der (r/h)-CRF-Konzentration auf 10 nM führt nicht zu einer Zunahme der Inhibition (**Abb. 47**).



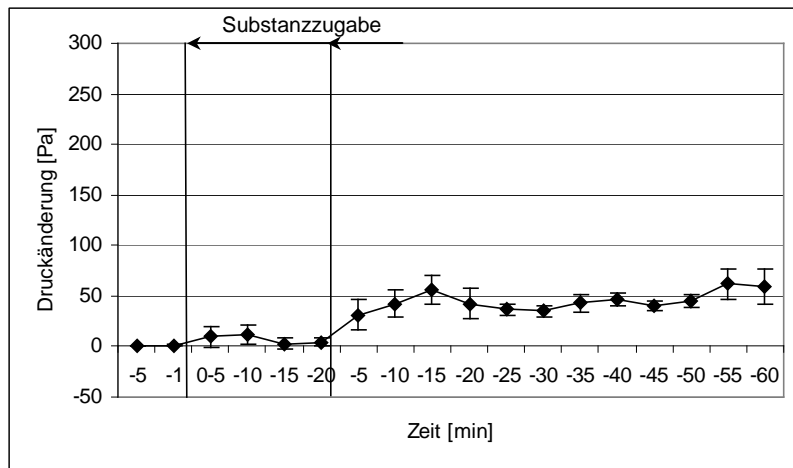
**Abb. 45:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Tyrodelösung + Midazolam 10  $\mu$ M**



**Abb. 46:  $\Delta$  PPT nach Applikation von (r/h)-CRF 1 nM + Midazolam 10  $\mu$ M**



**Abb. 47:  $\Delta$  PPT nach Applikation von (r/h)-CRF 10 nM + Midazolam 10  $\mu$ M**



**Abb. 48:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Astressin 100 nM + Midazolam 10  $\mu$ M**

### 3.5.2 Die selektiven Substanzen

Die selektiven Substanzen Stressin, Urocortin II, NBI 27914 und K 41498 werden getrennt nach ihrem agonistischen oder antagonistischen Charakter in Kombination mit Midazolam untersucht. In der Kombination von Midazolam mit den unselektiven Substanzen wird die optimale Wirkung des Agonisten bei 1 nM und die des Antagonisten bei 100 nM erzielt. Aus diesem Grund werden diese Konzentrationen auch für die selektiven Agonisten und Antagonisten beibehalten.

Das  $\Delta P_{\text{Peak}}$  der jeweiligen Kombination wird in **Tab. 15** und **Tab. 16** aufgeführt. Das  $\Delta P_{\text{Peak}}$  wird sowohl durch die Kombination des Midazolams mit einem selektiven Agonisten als auch mit einem selektiven Antagonisten deutlich größer. Demnach führt die Kombination einer selektiven Substanz mit Midazolam zu einer Zunahme der inhibitorischen Wirkung auf die Dünndarmperistaltik (**Tab. 15** und **Tab. 16**) im Vergleich zur Kontrollkombination (Tyrodelösung und Midazolam).

**Tab. 15:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  der Kombination Midazolam mit Stressin od. Urocortin II**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 162,85	$\pm$ 38,06	
Urocortin II 1 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 263,90	$\pm$ 39,93	0,088
Stressin 1 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 267,60	$\pm$ 36,66	0,067

**Tab. 16:  $\Delta P_{\text{Peak}}$  der Kombination Midazolam mit K 41498 od. NBI 27914**

Substanz	$\Delta P_{\text{Peak}}$ [Pa]	SEM [Pa]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 148,15	$\pm$ 28,31	
K 41498 100 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 216,44	$\pm$ 47,48	0,237
NBI 27914 100 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 232,13	$\pm$ 32,82	0,073

Die mittlere Latenz bis zum Peak der selektiven Agonisten zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (**Tab. 17**). Jedoch kommt es in der Kombination des NBI 27914 mit Midazolam zu einer Reduktion der Latenz bis zum Peak (**Tab. 18**). Dies bedeutet, dass es eine Reaktion des Ileums auf diese Substanzzugabe im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,09$ ) und der Kombination des K 41498 mit Midazolam gibt.

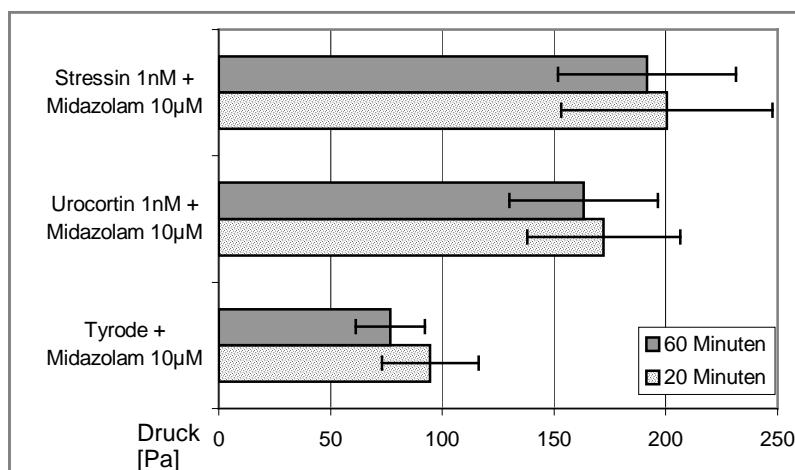
**Tab. 17: Mittlere Latenz bis zum Peak der Kombination Midazolam mit Stressin od. Urocortin II**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 23,75	$\pm$ 6,11	
Urocortin II 1 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 27,50	$\pm$ 8,29	0,721
Stressin 1 nM und Midazolam 10 $\mu\text{M}$	+ 21,25	$\pm$ 7,24	0,796

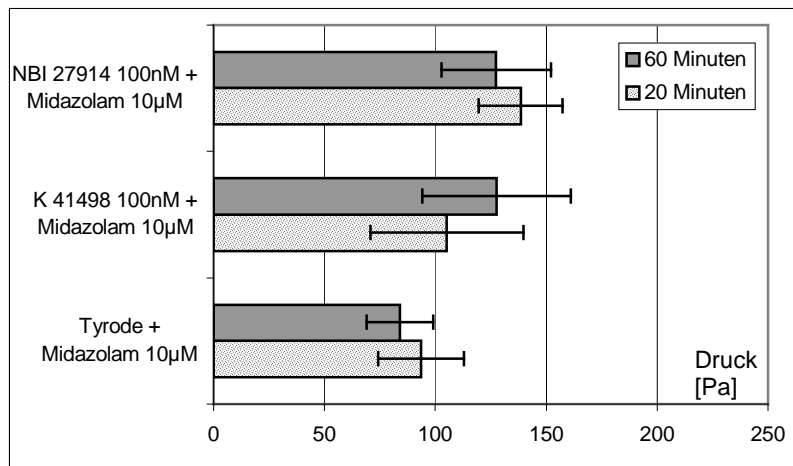
**Tab. 18: Mittlere Latenz bis zum Peak der Kombination Midazolam mit K 41498 od. NBI 27914**

Substanz	Latenz bis Peak [min]	SEM [min]	Signifikanz p
Tyrodelsg. und Midazolam 10 µM	+ 24,38	± 5,13	
K 41498 100 nM und Midazolam 10 µM	+ 33,13	± 6,12	0,292
NBI 27914 100 nM und Midazolam 10 µM	+ 13,75	± 2,63	0,087

Das  $\Delta$  PPT über die Zeit ist in **Abb. 49** dargestellt. Die beiden Kombinationen mit jeweils Midazolam und Stressin oder Urocortin II verursachen ein deutlich höheres  $\Delta$  PPT als die Kombination mit Tyrodelösung. Dabei besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Kombination mit Midazolam und einem der beiden selektiven Agonisten. Dasselbe gilt auch für die Kombinationen mit jeweils Midazolam und einem selektiven Antagonisten (NBI 27914 oder K 41498, **Abb. 50**), jedoch fällt dieser Effekt hier nicht so deutlich aus und ist nicht signifikant. Insgesamt wird durch Zugabe einer der selektiven Substanzen eine Zunahme der Inhibition bewirkt. Es ist unklar, weshalb der 20 Minutenwert von K 41498 und Midazolam kleiner ist als der 60 Minutenwert. Dies würde bedeuten, dass es zu keiner Reaktion der Peristaltik gekommen ist.

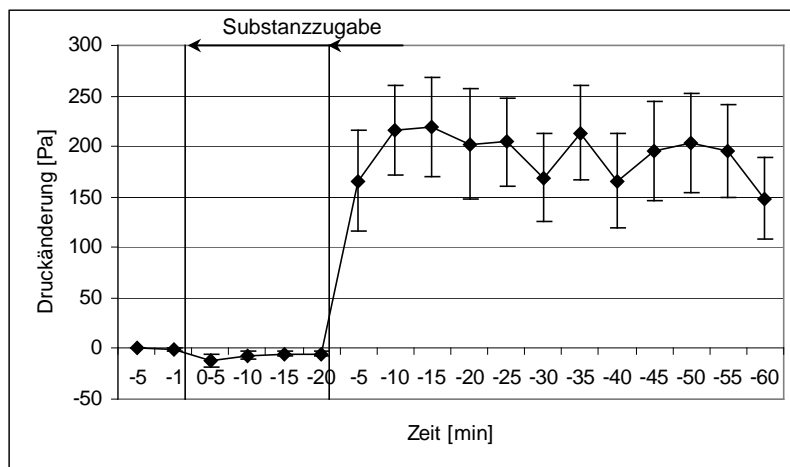


**Abb. 49:  $\Delta$  PPT nach 20 und 60 Minuten nach Applikation der selektiven Agonisten und Midazolam**

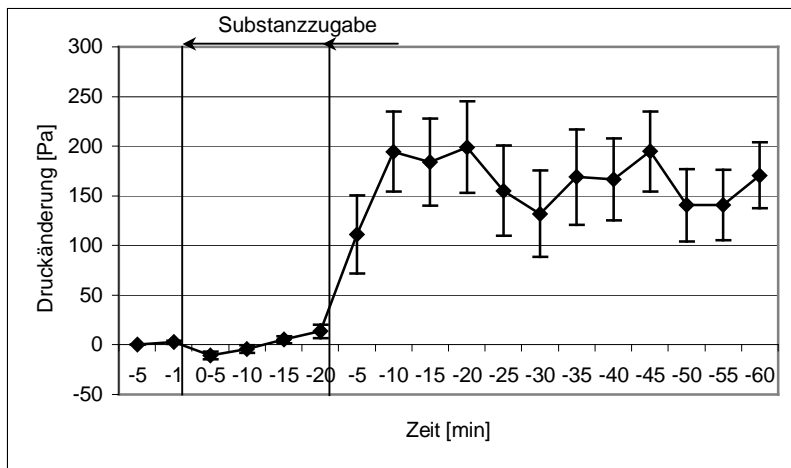


**Abb. 50:  $\Delta$  PPT nach 20 und 60 Minuten nach Applikation der selektiven Antagonisten und Midazolam**

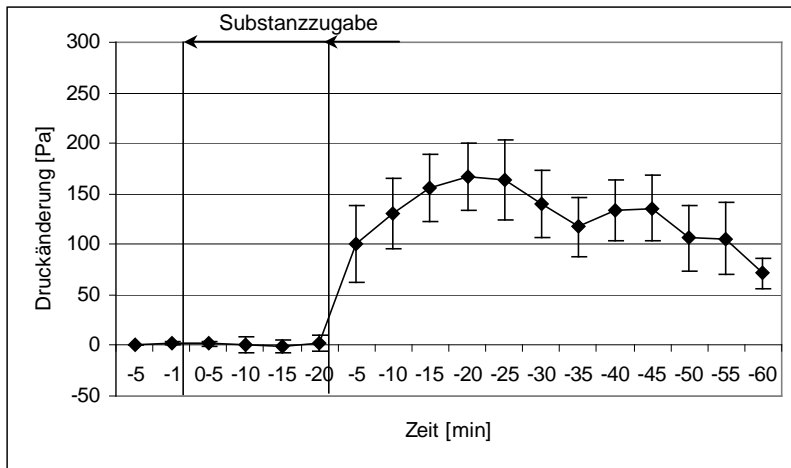
Die Kombinationen von Midazolam und Stressin oder Urocortin II haben einen stärkeren Anstieg des Schwellendrucks ( $\Delta$  PPT) als die Kombination mit Tyrodelösung (**Abb. 51**, **Abb. 52** und **Abb. 60**) herbeigeführt. Dies gilt nicht für die Kombinationen NBI 27914 oder K 41498 mit jeweils Midazolam. Hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrollkombination mit Tyrodelösung kein wesentlicher Effekt auf die Dünndarmperistaltik (**Abb. 53**, **Abb. 54** und **Abb. 61**). Das  $\Delta$  PPT des Schwellendrucks kann nur durch die Zugabe eines selektiven Agonisten moduliert werden, im Sinne einer Zunahme der Inhibition.



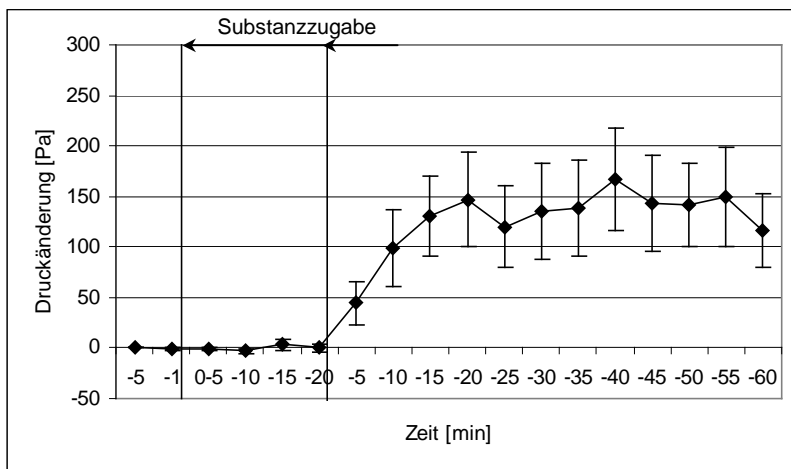
**Abb. 51:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Stressin 1 nM + Midazolam 10 µM**



**Abb. 52:  $\Delta$  PPT nach Applikation von Urocortin II 1 nM + Midazolam 10  $\mu$ M**



**Abb. 53:  $\Delta$  PPT nach Gabe von NBI 27914 100 nM + Midazolam 10  $\mu$ M**



**Abb. 54:  $\Delta$  PPT nach Applikation von K 41498 100 nM + Midazolam 10  $\mu$ M**

## 4 Diskussion

Nach wie vor sind gastrointestinale Störungen bei intensivmedizinisch versorgten Patienten ein großes Problem (Herbert und Holzer, 2008). Diese ziehen oftmals Komplikationen nach sich, welche Einfluss auf die Gesamtprognose haben können (Reintam et al., 2006; Fruhwald et al., 2007). Aus diesem Grund wird der Einfluss von Stressmediatoren wie (r/h)-CRF und dessen verwandte Peptide auf die Dünndarmperistaltik untersucht. In weiteren Experimenten wird die Interaktion dieser Stressmediatoren mit dem im klinischen Alltag gängigen Hypnotikum Midazolam untersucht.

Es kann gezeigt werden, dass die Agonisten die Peristaltik konzentrationsabhängig stimulieren und die Antagonisten keine Wirkung auf die Ileumperistaltik haben. Eine Aufhebung der Wirkung des jeweiligen Agonisten durch den entsprechenden Antagonisten ist *in vitro* nicht möglich. Die Experimente mit Midazolam in Kombination mit den „Stresspeptiden“ führen zu unerwarteten Ergebnissen.

Als Rezeptoren für diese „Stresspeptide“ dienen im Magen-Darm-Trakt CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren befinden sich im Colon und führen bei Aktivierung zur Motilitätssteigerung, Verkürzung der Passagezeit des Darminhalts und zur Beschleunigung der Defäkation (Maillot et al., 2000; Million et al., 2002; Martínez et al., 2002 u. 2004b; Taché et al., 2004). CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren hingegen befinden sich im Magen, hemmen die Magenentleerung und setzen die Kontraktilität herab (Maillot et al., 2000; Million et al., 2002; Martínez et al., 2002 u. 2004b; Taché et al., 2004). Das Ileum liegt zwischen Magen und Colon. Funktionell bildet es den Übergang zwischen Hemmung der Magenentleerung und Steigerung der Colonmotilität. Im Magen befinden sich hauptsächlich CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren, wohingegen im Colon mehr CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren nachgewiesen worden sind. Im Ileum selbst befinden sich beide Rezeptorsubpopulationen. Durch Aktivierung verursachen sie eine Stimulation der Peristaltik, wie in dieser Arbeit gezeigt und in der Literatur (Lázár et al., 2003; Liu et al., 2005) beschrieben ist.



## **4.1 Betrachtung des Versuchsaufbaus, der Versuchsdurchführung und der Auswertung**

Die Methodik, die in dieser Arbeit angewandt wird, ist erstmalig von Trendelenburg (1917) systematisch erarbeitet worden. Dieser beschrieb das Verhalten der Längs- und Ringmuskulatur am isolierten, mit Tyrode perfundierten Meerschweinchendünndarm. Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau wurde bereits mehrfach in dieser und ähnlicher Form verwendet und detailliert beschrieben (Holzer und Petsche, 1983; Holzer und Maggi, 1994; Waterman et al., 1994).

Die Induktion der Peristaltik und deren Beeinflussung wurde ebenfalls von Trendelenburg (1917) beschrieben. In weiteren Arbeiten wurden seine Erkenntnisse weiterentwickelt (Holzer und Lembeck, 1979; Waterman et al., 1994; Holzer et al., 1997). Die Applikation der Wirkstoffe extraserosal ist ausreichend, um per Diffusion eine adäquate Reaktion hervorzurufen (Maillot et al., 2000; Taché et al., 2004).

Für die Auswertung der peristaltischen Aktivität wird der Schwellendruck ( $\Delta$  PPT) herangezogen. Er trennt die Füllungsphase von der Auswurfphase einer Kontraktion und stellt somit die maximale Wandspannung und einen guten Messwert für die peristaltische Aktivität dar (Holzer und Maggi, 1994; Waterman et al., 1994; Holzer et al., 1997; Herbert et al., 2005). Im Gegensatz zum Schwellenwert ist die Frequenz nicht sensitiv genug, um die herbeigeführten Veränderungen in der Peristaltik wiederzugeben (Holzer und Maggi, 1994).

Ein Vorteil dieses Versuchsaufbaus liegt darin, dass das System gut standardisierbar und etabliert ist. Es ist eine gute Reproduzierbarkeit der Untersuchungsbedingungen gegeben. Aufgrund der Möglichkeit, bis zu fünf Experimente gleichzeitig durchzuführen, ist die Einhaltung einer aussagekräftigen Stichprobengröße möglich.

Limitiert wird das System durch die makroskopische Betrachtungsweise. Auf eine Aktion (Substanzzugabe) folgt eine Reaktion (Modulierung der Peristaltik). Eine Analyse komplexer Interaktionsmechanismen ist nicht möglich, da die molekularbiologische Perspektive nicht betrachtet werden kann.

## 4.2 Agonisten, Antagonisten und deren Wechselwirkung

In dieser Arbeit zeigt sich für die **Agonisten**, dass mit zunehmender Konzentration das  $\Delta P_{\text{Peak}}$  negativer und das Maximum der Antwort innerhalb der ersten 20 Minuten erreicht wird. Somit ist eine Reaktion der Peristaltik auf die Zugabe eines Agonisten innerhalb der ersten 20 Minuten konzentrationsabhängig zu erkennen. Mit Zunahme der Konzentration kann sich auch die Latenz bis zum Eintreten der induzierten Wirkung verkürzen. An der Aktivierung der Peristaltik durch die G-Protein-gekoppelten CRF-Rezeptoren ist intrazelluläres cAMP beteiligt (Hamar, 2004). Durch die Rezeptoraktivierung kommt es zur Akkumulation des second messengers im Intrazellularraum und zu einer Stimulation der Peristaltik (Million et al., 2002; Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004a).

Die jeweils verwendeten Agonisten ((r/h)-CRF, Stressin, Urocortin II) binden mit unterschiedlicher Affinität an die beiden Rezeptorsubtypen CRF<sub>1</sub> und CRF<sub>2</sub> und lösen in unterschiedlichem Maß die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Adenylatcyclase aus. Die stärkere Aktivierung der Adenylatcyclase durch CRF<sub>2</sub>-selektive Substanzen ist eine Erklärung für die potentere Wirkung von Urocortin II im Gegensatz zu dem CRF<sub>1</sub>-selektiven Stressin (Perrin und Vale, 1999; Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004a). (r/h)-CRF ist eine CRF<sub>1</sub>-präferierende Substanz und benötigt wie Stressin eine höhere Substanzkonzentration, um eine ähnliche Wirkung wie Urocortin II zu erzielen.

Die in dieser Arbeit beschriebene dosisabhängige Stimulation der Peristaltik durch (r/h)-CRF, Stressin und Urocortin II stimmt mit der in der Literatur beschriebenen überein (Maillot et al., 2000; Martínez et al., 2002 u. 2004a; Taché et al., 2004). Daneben ist auch die direkte Inhibition von (r/h)-CRF auf die zökale glatte Muskulatur beschrieben (Hanani und Wood, 1992; Iwakiri et al., 1996). In dieser Arbeit kann für die 1 nM-Konzentration von (r/h)-CRF kein Einfluss auf die Dünndarmperistaltik festgestellt werden. Die Dünndarmmotilität der 1 nM-Konzentration von (r/h)-CRF unterscheidet sich nicht von der einer Tyrodekontrolle. Es wird weder eine Stimulation noch eine Inhibition durch diese Konzentration ausgelöst.

Eine weitere unerwartete Wirkung ist die des Stressins in einer 30 nM-Konzentration. Bei dieser Versuchsreihe des CRF<sub>1</sub>-selektiven Agonisten zeigt sich, dass die 30 nM-Konzentration die Peristaltik ähnlich wie 100 nM stimuliert, bei großem SEM (Standardfehler). Eventuell könnte die ähnliche Stimulation der Peristaltik eine Folge einer Rezeptorkonfigurationsänderung sein. Der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor kann drei verschiedene Stadien annehmen: R-Stadium (nicht an G-Protein gekoppelt, geringe Substrataffinität), RG-Stadium (gekoppelt, hohe Substrataffinität), R<sub>0</sub>-Stadium (seltenes Stadium, hohe Substrataffinität, kein G-Protein nachweisbar) (Hoare et al., 2003). Das RG-Stadium hat eine hohe Substrataffinität. Es ist anzunehmen, dass dieses Rezeptorenstadium bei 30 nM und 100 nM gleichmäßig besetzt wird und somit eine annähernd identische Aktivierung der Peristaltik verursacht wird. Bei der höheren Substratkonzentration von 100 nM könnte auch das Aktivierungsstadium R des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors trotz geringer Substrataffinität vermehrt besetzt werden. Das heißt, dass das Substrat nicht am wirkungspotenterem RG-Stadium binden und eine wesentliche Stimulation der Peristaltik durch das andere Rezeptoraktivierungsstadium aufgrund des ungebundenen G-Proteins nicht erfolgen kann.

Die **Antagonisten** hingegen rufen wie bereits zuvor berichtet keine nennenswerte Reaktion am Ileum hervor (Million et al., 2002; Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004b).

Eine Ausnahme bildet NBI 27914 (100 nM). Da wie bereits erwähnt, eine Reaktion der Peristaltik auf einen Agonisten innerhalb der ersten 20 Minuten zustande kommt, kann der mäßige Anstieg des  $\Delta$  PPT nicht als direkter CRF<sub>1</sub>-vermittelter Effekt gewertet werden. Dieser Effekt könnte auf den nicht-peptidischen Charakter (s.u.) und die dadurch bedingte allosterische Konformationsänderung durch NBI 27914 am CRF<sub>1</sub>-Rezeptor zurückzuführen sein (Hoare et al., 2003). In dieser Arbeit wird nur ein einziger nichtpeptidischer Antagonist verwendet, weitere müssten untersucht werden, um diese Effekte weiter zu klären.

Die Vorbehandlung des Ileums mit einem Antagonisten beeinflusst die Wirkung des jeweiligen Agonisten im Sinne einer **Antagonisierung** nicht. In allen

4 Kategorien ( $\Delta P_{\text{Peak}}$  und mittlere Latenz bis Peak,  $\Delta \text{PPT}$  über 20 und 60 Minuten und  $\Delta \text{PPT}$ -Kurve) können keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den zu antagonisierenden Wirkstoffen gesehen werden. Dafür kann es unterschiedliche Ursachen geben:

Es wird die 3-6fache Menge von Astressin benötigt, um die (r/h)-CRF induzierte Wirkung aufzuheben (Maillot et al., 2000; Martínez et al., 2002). Da K 41498 wie Astressin ein peptidischer Antagonist ist, könnte auch K 41498 eine höhere Konzentration benötigen, um die Wirkung von Urocortin II zu antagonisieren.

Der nichtpeptidische Antagonist NBI 27914 kann peripher appliziert, die (r/h)-CRF induzierte Wirkung nur partiell antagonisieren (Taché et al., 2004). Als Grund werden andere Bindungseigenschaften und ein anderer Bindungsort am CRF<sub>1</sub>-Rezeptor diskutiert (Hoare et al., 2003; Taché et al., 2004).

### **4.3 Midazolam**

Zu der Substanz Midazolam und dessen Wirkung auf die Peristaltik des Meer-schweinchendünndarms gibt es bereits frühere Daten dieser Arbeitsgruppe (Wenderoth, 2002). Diese zeigen *in vitro* einen inhibitorischen Effekt. In dieser Arbeit kann dies bestätigt und eine überwiegend inhibitorische Wirkung durch die Kombination von Midazolam mit einem der Stressmediatoren (Agonisten und Antagonisten) erzeugt werden. Interessant ist, dass bereits kleine Konzentrationen (1 nM) der agonistischen Stressmediatoren ausreichen, um einen deutlichen Effekt zu erzielen.

Bereits die 1 nM (r/h)-CRF Konzentration kann in Kombination mit Midazolam die inhibitorische Wirkung des Benzodiazepins deutlich verstärken. Eine Kombination von Midazolam mit Astressin 100 nM führte zu einer Abnahme der Midazolamwirkung. Astressin selbst zeigt zunächst wie (r/h)-CRF 1 nM im Einzelversuch keine Wirkung auf die Peristaltik. Offensichtlich demaskiert die Midazolamzugabe die zuvor fehlende Wirkung dieser Substanzen bzw. Konzentrationen. In der Erwartung eine noch ausgeprägtere inhibitorische Wirkung als bei der 1 nM-Konzentration des (r/h)-CRF auszulösen, wird (r/h)-CRF in einer 10 nM-Konzentration in das Wasserbad gegeben. Diese Menge

führt zu keiner Reaktion. Deshalb werden im Folgenden nur noch Agonisten in der 1 nM-Konzentration verwendet.

Zusammengefasst führt die Kombination von Midazolam mit einem Stressmediator zu einer unerwarteten stimulierenden oder inhibitorischen Wirkung auf die Dünndarmperistaltik. Deren Ursache kann nicht geklärt werden.

Die Kombination von (r/h)-CRF mit Acetylcholin übt einen curareähnlichen Effekt auf den Meerschweinchendünndarm aus (Hanani und Wood, 1992). Die Autoren vermuten eine Art physiologisches Gleichgewicht (Hanani und Wood, 1992; Lázár et al., 2003; Martínez et al., 2004a) zwischen Stimulation und Inhibition. Dieses Gleichgewicht könnte durch die Zuführung der jeweiligen Substanzen gestört werden (Brookes, 2001; Martínez et al., 2004a). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum eine inhibitorische Substanz wie Midazolam in Kombination mit einem unselektiven Antagonisten wie Astressin zu einer Reduktion der Midazolam-induzierten Inhibition führt. Es erklärt nicht, warum ein selektiver Antagonist (NBI 27914 oder K 41498), welcher nur mit einem CRF-Rezeptorsubtyp in Interaktion tritt, diesen Effekt nicht auslösen kann.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit ist, dass die Kombination der Substanzen (r/h)-CRF und Acetylcholin zu einem paradoxen Effekt, ähnlich der Kombination von (r/h)-CRF und Midazolam, führt. Letztgenannte Kombination zeichnet sich durch die Zunahme der Inhibition nach Zugabe der propulsiven Substanz (r/h)-CRF aus.

Eine andere Erklärung für die Wechselwirkungen der Stresspeptide mit Midazolam könnte in der Veränderung des intrazellulären Stoffwechsels der Zelle durch die Bindung von Midazolam am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor gesehen werden. Diese Stoffwechseländerung könnte zu einer verminderten Expression des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors, zu einer intrazellulären Hemmung des aktiven G-Proteins oder zu einer Hemmung der intrazellulären cAMP-Akkumulation führen. Auch eine intrazelluläre Stimulation der Öffnungsdauer des GABA<sub>A</sub>-abhängigen Chloridkanals durch (r/h)-CRF und seiner Agonisten ist denkbar.

Wie (r/h)-CRF verstärken die beiden selektiven Agonisten Stressin und Urocortin II in der 1 nM-Konzentration auch die inhibitorische Wirkung von Mida-

zolam. Die Inhibition der Peristaltik ist ausgeprägter als bei der unselektiven Substanz (r/h)-CRF. Auch die selektiven Antagonisten, NBI 27914 und K 41498, verstärken die inhibitorische Wirkung des Midazolams geringfügig. Ihre Wirkung ist schwächer als die der selektiven Agonisten. Dies ist nicht erwartet worden. Scheinbar ist die Aktivierung vorwiegend eines CRF-Rezeptorsubtyps mit der Verstärkung der Midazolam-induzierten Inhibition vergesellschaftet. Dabei darf nicht vergessen werden, dass (r/h)-CRF eine CRF<sub>1</sub>-Präferenz besitzt. Die einzige Substanz, welche mit gleicher Affinität an beide Rezeptorsubtypen bindet, ist Astressin.

Die verwendeten Stresspeptide kann man nicht nur getrennt nach agonistischen und antagonistischen Wirkprinzipien, sondern auch entsprechend ihrer Rezeptorselektivität betrachten. Diese Effekte auf das  $\Delta P_{Peak}$ , die mittlere Latenz bis Peak, das  $\Delta PPT$  nach 20 und 60 Minuten und das  $\Delta PPT$  sind nicht signifikant, so dass man nur Hypothesen aufstellen kann. Die CRF<sub>1</sub>-selektiven Substanzen, Agonisten wie Antagonisten, scheinen in Verbindung mit Midazolam eine stärkere additive inhibitorische Wirkung als die CRF<sub>2</sub>-selektiven zu haben. Da (r/h)-CRF eine höhere Affinität zu CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren besitzt, verhält es sich ähnlich wie die CRF<sub>1</sub>-selektiven Substanzen, wenn auch nicht mit der selben potenten Wirkung. Astressin hingegen ist die einzige Substanz, welche eine gleich starke Affinität zu beiden CRF-Rezeptorsubpopulationen aufweist. Astressin ist auch die einzige Substanz, welche die Midazolamwirkung deutlich abschwächt. Die Substanzkombination zeichnet sich durch ein kleines  $\Delta P_{Peak}$  und ein höheres  $\Delta PPT$  über 60 Minuten als über 20 Minuten aus. Aus diesen Gründen kann angenommen werden, dass Astressin der Midazolamwirkung entgegenwirkt. Diese Antagonisierung führt in Summe zu einer Förderung der Peristaltik im Vergleich zur Kontrolle.

Midazolam selbst wirkt direkt an der glatten Muskulatur auf das Membranpotential (Wenderoth, 2002; Lüllmann et al., 2003), dies führt zu einer Inhibition der Peristaltik. (r/h)-CRF und seine verwandten Peptide aktivieren G-proteingekoppelte Rezeptoren und stimulieren auf diesem Weg die neuronale Adenylatcyclase. Dies führt zu einer Stimulation der Peristaltik, möglicherweise über eine Acetylcholinfreisetzung (Hanani und Wood, 1992; Million et al., 2002;

Lázár et al., 2003; Taché et al., 2004; Martínez et al., 2004a; Liu et al., 2005). Daneben gibt es auch direkt neuronal vermittelte Wege über den CRF<sub>1</sub>-Rezeptor, welcher sowohl im Plexus submucosus als auch im Plexus myentericus lokalisiert ist (Hanani und Wood, 1992; Million et al., 2002; Lázár et al., 2003; Taché, 2004). Die über den CRF<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelten Effekte können nicht sicher einer neuronalen, muskulären oder mucosassoziierten Struktur zugeordnet werden. Jedoch führt die Aktivierung beider Rezeptoren zu einer Stimulation der Adenylatcyclase, je nach Subtyp mehr oder minder ausgeprägt. Die Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in der Submucosa des Meerschweinchendünndarms führt u.a. über cholinerge sekretorische Motoneurone zu einer Zunahme der Sekretion von Chloridionen ins Darmlumen (MacNaughton et al., 1996). Die Interaktion über Acetylcholin könnte ursächlich für die erhöhte  $\Delta$  PPT (geringgradig, bei großem SEM) der CRF<sub>1</sub>-rezeptorselektiven Substanzen in Kombination mit Midazolam im Vergleich zu den CRF<sub>2</sub>-rezeptorselektiven sein.

Daraus kann man folgende Hypothesen ableiten:

Erstens, dass eine (r/h)-CRF-induzierte neuronale Stimulation der Peristaltik aufgrund der Midazolam-induzierten muskulären Inhibition der Peristaltik zu einer gegenseitigen Aufhebung bzw. Verstärkung der Effekte führt. Zweitens, könnte es durch eine Kombination der beiden Substanzgruppen über die gemeinsame Acetylcholinsekretion zu weiteren Sekundärmechanismen mit additiver Wirkung kommen. Diese können sowohl inhibitorisch als auch propulsiv sein. Drittens, scheint es eine Art Interaktion zwischen den beiden CRF-Rezeptoren zu geben. Dieser „cross-talk“ (Brookes, 2001; Martínez et al., 2004a) kann erklären, weshalb die Zugabe der selektiven Antagonisten eine additive inhibitorische Wirkung in der Kombination mit Midazolam haben. In wie weit die Interaktion der CRF-Rezeptoren untereinander mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor interagieren ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar.

Es kann nur spekuliert werden, welche Mechanismen zu den oben genannten Ergebnissen beitragen. Wahrscheinlich ist eine Interaktion von Midazolam und CRF-selektiven Substanzen an der postsynaptischen Membran der glatten

Muskelzelle. Denkbare wäre auch eine Modulation der intrazellulären Signalwege durch Midazolam und CRF-selektive Substanzen. Dabei sollte bedacht werden, dass die Aktivierung von Acetylcholin durch (r/h)-CRF und seine selektiven Agonisten beeinflusst werden kann. Inwiefern Acetylcholin und seine Signalwege Einfluss auf die induzierte Inhibition der Peristaltik haben, muss näher untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Auf Intensivstationen wurden gastrointestinale Störungen als Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität identifiziert. Etwa 80% der Patienten hatten nach einer Woche auf der Intensivstation gastrointestinale Störungen. Dies wird bedingt durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren wie z.B. Abdominalchirurgie, Verletzungen der Neuroachse, SIRS, Hypoxämie, Störungen der Wasser-Elektrolyt-Hämöostase oder Säure-Basen-Gleichgewichts sowie Gabe von Analgetika, Hypnotika, Katecholamine oder Clonidin. Daher stellt sich die Frage, welchen Einfluss Stressmediatoren auf das gastrointestinale Gleichgewicht haben. In dieser Arbeit wird die Wirkung des Stressmediators (r/h)-CRF sowie natürlicher und synthetischer Agonisten und Antagonisten auf die Peristaltik des Meerschweinchendünndarms untersucht. Des Weiteren werden Wechselwirkungen zwischen den Stressmediatoren und dem klinisch zur Sedierung von Intensivpatienten eingesetzten Benzodiazepin Midazolam untersucht.

Die Experimente werden an Dünndarmsegmenten des Meerschweinchens *in vitro* durchgeführt, die kontinuierlich und gegen einen geringen Widerstand endoluminal mit Tyrodelösung perfundiert werden. In dieser Versuchsvorrichtung wird in den Darmsegmenten ab einem bestimmten intraluminalen Druck (peristaltic pressure threshold, PPT) eine von oral nach aboral verlaufende peristaltische Kontraktionswelle ausgelöst und der Darminhalt ausgeworfen. Die Peptide werden extraserosal in das Organbad gegeben. Unter dem Einfluss der Agonisten ((r/h)-CRF, Stressin, Urocortin II) steigt die  $\Delta$  PPT konzentrationsabhängig auf große negative Werte an und es zeigt sich eine Stimulation der



Peristaltik. Die Antagonisten (Astressin, NBI 27914, K 41498) hingegen lösen keine Modulation der Peristaltik aus. Durch die Vorbehandlung mit den Antagonisten wird eine Unterbindung der agonistischen Wirkung versucht. Diese gelingt nicht. In Kombination mit Midazolam kann ein überraschender additiv inhibitorischer Effekt der CRF-rezeptorselektiven Agonisten und Antagonisten gezeigt werden. Die Wirkung von Astressin, welches gleich hohe Affinität für den CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptor aufweist, hebt diejenige des Benzodiazepins partiell auf.

Über die Signaltransduktion zur Induktion bzw. Inhibition der Peristaltik kann nur gemutmaßt werden. In Frage kommen einige Mechanismen, deren Zusammenspiel untereinander noch nicht geklärt ist. Zu diesen Mechanismen zählt der sogenannte „cross-talk“ der G-protein-gekoppelten Rezeptoren. Möglicherweise findet auch eine direkte Interaktion mit dem GABA-ergen Rezeptor statt. Es kommt im Weiteren zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase, zur cAMP-Akkumulation, Kalziumfreisetzung und Kontraktion der glatten Muskulatur des Ileums. Ein anderer Mechanismus involviert die Acetylcholinsekretion. Dieses Molekül scheint jedoch eine entscheidende Rolle zu spielen. Denkbar sind einige, durch G-Proteine vermittelte allgemein bekannte Wege, z.B. über Interaktion mit Enzymen, Kalium- oder Kalziumkanälen oder die Genexpression. Letztlich hat Acetylcholin Auswirkungen auf die Peristaltik des Ileums und dessen Permeabilität. Ein direkt neuronal vermittelter Weg über den CRF<sub>1</sub>-Rezeptor führt ebenfalls zur Stimulation der Peristaltik. Neben diesen Bausteinen spielen noch andere biochemische Mechanismen eine Rolle wie z.B. die Rezeptorkonfiguration oder die Bindungseigenschaften des Ligandens in Abhängigkeit des peptidischen oder nichtpeptidischen Substanzcharakters.

## **6 Summary**

The topic of this research work is the influence of stress on the small intestine motor function of the guinea pig mediated through peptides like (r/h)-CRF and related peptides. There are unselective ones like (r/h)-CRF as an agonist and Astressin as an antagonist, but also selective agonists and antagonists for the CRF<sub>1</sub>- and CRF<sub>2</sub>-receptor (Stressin as agonist and NBI 27914 as antagonist of

CRF<sub>1</sub>-receptor; Urocortin II as agonist and K 41498 as antagonist of CRF<sub>2</sub>-receptor).

Gastrointestinal dysmotility has been identified as a risk factor for higher mortality in intensive care units (ICU). About 80% of all patients being admitted at an ICU developed gastrointestinal dysmotility during the first week. This is induced by different causes like abdominal surgery, injury of the CNS, SIRS, hypoxaemia, imbalance of acid-base and electrolytes and fluid status, application of analgetics, hypnotics, catecholamines or clonidin. It is necessary to consider stress peptides induced disturbances of intestinal motor function and possible stress-drug interactions. For this reason an often used drug like Midazolam, a benzodiazepine was further characterized.

All experiments have been done *in vitro* at the small intestine of guinea pig. The small intestine has been extracted and brought to a nearly physiological environment. It has been flushed with tyrode's fluid, a physiological fluid, till gathering a certain intraluminal pressure (peristaltic pressure threshold, PPT); necessary for inducing the physiological peristaltic reflex. This reflex transported the intraluminal contents to the aboral ending of the reviewed piece of guinea pig's small intestine. All agonists ((r/h)-CRF, Stressin, Urocortin II) induced a dose-dependent stimulation of the small intestine motor function, whereas the antagonists (Astressin, NBI 27914, K 41498) showed no effect. Studying the agonist-antagonist interaction was not successful. Pretreatment of the small intestine with Midazolam did surprisingly increase the inhibitory effect on the gut motility. Except of the unselective antagonist Astressin, it annulled parts of Midazolam induced inhibition.

In summary there is not much known of the pathways of (r/h)-CRF and CRF-like peptides. There might be a receptor cross-talk between the CRF<sub>1</sub>- and CRF<sub>2</sub>- or the GABA<sub>A</sub>-related receptor. At a certain point the intracellular adenylate cyclase is involved and causes an accumulation of cAMP, a release of calcium and a contraction of smooth muscle cells. Another pathway interacts with acetylcholine. This might be important because of acetylcholine G-protein related cell tasks like translation of enzymes, ion channel activation or gene

expression profiles. Finally acetylcholine modulates the gut motor function and its mucosal permeability. A third possible pathway is mediated through the CRF<sub>1</sub>-receptor and neuronal plexus causing stimulation of small intestine motor function. There might even be more pathways depending on receptor configuration or binding sites or the chemical character of a certain peptide. This will need further investigation.

## **7 Literaturverzeichnis**

**Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.** (2003) Biochemie; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 5. Auflage: 388, 436, 439f.

**Bhatia, V. and R. K. Tandon** (2005). "Stress and the gastrointestinal tract." J Gastroenterol Hepatol **20**(3): 332-9.

**Bradley, W.G., Daroff, R.B., et al.** (2008) Neurology in Clinical Practice; Butterworth-Heinemann, an imprint of Elsevier Inc. 5. Auflage: 832.

**Brar, B. K., A. Chen, et al.** (2004). "Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2beta by the CRF/urocortin family of peptides." Endocrinology **145**(4): 1718-29.

**Brookes, S. J.** (2001). "Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine." Anat Rec **262**(1): 58-70.

**Fruhwald, S., P. Holzer, et al.** (2007). "Intestinal motility disturbances in intensive care patients pathogenesis and clinical impact." Intensive Care Med **33**(1): 36-44.

**Fruhwald, S., P. Holzer, et al.** (2008). "Gastrointestinal motility in acute illness." Wien Klin Wochenschr **120**(1-2): 6-17.

**Hanani, M. and J. D. Wood** (1992). "Corticotropin-releasing hormone excites myenteric neurons in the guinea-pig small intestine." Eur J Pharmacol **211**(1): 23-7.

**Harmar, A. J.** (2004). "Clinical endocrinology and metabolism. Receptors for gut peptides." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **18**(4): 463-75.

- Hauger, R. L., D. E. Grigoriadis, et al.** (2003). "International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands." *Pharmacol Rev* **55**(1): 21-6.
- Herbert, M. K., R. Weis, et al.** (2005). "Peristalsis in the Guinea pig small intestine in vitro is impaired by acetaminophen but not aspirin and dipyron." *Anesth Analg* **100**(1): 120-7.
- Herbert, M. K. and P. Holzer** (2008). "Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients--current status and future options." *Clin Nutr* **27**(1): 25-41.
- Hoare, S. R., S. K. Sullivan, et al.** (2003). "Mechanism of corticotropin-releasing factor type I receptor regulation by nonpeptide antagonists." *Mol Pharmacol* **63**(3): 751-65.
- Hoare, S. R., S. K. Sullivan, et al.** (2004). "Ligand affinity for amino-terminal and juxtamembrane domains of the corticotropin releasing factor type I receptor: regulation by G-protein and nonpeptide antagonists." *Biochemistry* **43**(13): 3996-4011.
- Holzer, P. and F. Lembeck** (1979). "Effect of neuropeptides on the efficiency of the peristaltic reflex." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **307**(3): 257-64.
- Holzer, P., I. T. Lippe, et al.** (1997). "Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine." *J Pharmacol Exp Ther* **280**(1): 154-61.
- 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.
- Holzer, P. and U. Petsche** (1983). "On the mechanism of contraction and desensitization induced by substance P in the intestinal muscle of the guinea-pig." *J Physiol* **342**: 549-68.
- Iwakiri, Y., Y. Chijiwa, et al.** (1996). "Direct inhibitory effect of corticotropin releasing hormone on isolated caecal circular smooth muscle cells of guinea pig via adenylate cyclase system." *Life Sci* **58**(24): 2243-9.

- la Fleur, S. E., E. C. Wick, et al.** (2005). "Role of peripheral corticotropin-releasing factor and urocortin II in intestinal inflammation and motility in terminal ileum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7647-52.
- Lawrence, A. J., E. V. Krstew, et al.** (2002). "The highly selective CRF(2) receptor antagonist K41498 binds to presynaptic CRF(2) receptors in rat brain." *Br J Pharmacol* **136**(6): 896-904.
- Lazar, Z., R. Benko, et al.** (2003). "Actions of endothelin and corticotropin releasing factor in the guinea-pig ileum: no evidence for an interaction with capsaicin-sensitive neurons." *Neuropeptides* **37**(4): 220-32.
- Liu, S., X. Gao, et al.** (2005). "Expression of type 1 corticotropin-releasing factor receptor in the guinea pig enteric nervous system." *J Comp Neurol* **481**(3): 284-98.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.** (2003) *Pharmakologie und Toxikologie*; Georg Thieme Verlag. 15. Auflage: 303, 340f, 343.
- MacNaughton, W. K., Pineau, B.C., et al.** (1996). "γ-Aminobutyric acid stimulates electrolyte transport in the guinea pig ileum in vitro." *Gastroenterology* **110**(2): 498-507.
- Maillot, C., M. Million, et al.** (2000). "Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats." *Gastroenterology* **119**(6): 1569-79.
- Martinez, V., J. Rivier, et al.** (1999). "Peripheral injection of a new corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist, astressin, blocks peripheral CRF- and abdominal surgery-induced delayed gastric emptying in rats." *J Pharmacol Exp Ther* **290**(2): 629-34.
- Martinez, V., L. Wang, et al.** (2004a). "Central CRF, urocortins and stress increase colonic transit via CRF1 receptors while activation of CRF2 receptors delays gastric transit in mice." *J Physiol* **556**(Pt 1): 221-34.
- Martinez, V., L. Wang, et al.** (2004b). "Urocortins and the regulation of gastrointestinal motor function and visceral pain." *Peptides* **25**(10): 1733-44.
- Martinez, V., L. Wang, et al.** (2002). "Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric

emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(2): 611-7.

**Million, M., C. Maillot, et al.** (2002). "Human urocortin II, a new CRF-related peptide, displays selective CRF(2)-mediated action on gastric transit in rats." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(1): G34-40.

**Million, M., L. Wang, et al.** (2000). "Differential Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, sacral parasympathetic nucleus and colonic motor response to water avoidance stress in Fischer and Lewis rats." *Brain Res* **877**(2): 345-53.

**Muramatsu, Y., K. Fukushima, et al.** (2000). "Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa." *Peptides* **21**(12): 1799-809.

**Pan, H. and M. D. Gershon** (2000). "Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine." *J Neurosci* **20**(9): 3295-309.

**Perrin, M. H. and W. W. Vale** (1999). "Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family." *Ann N Y Acad Sci* **885**: 312-28.

**Porcher, C., A. Juhem, et al.** (2005). "Expression and effects of metabotropic CRF1 and CRF2 receptors in rat small intestine." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(5): G1091-103.

**Reintam, A., P. Parm, et al.** (2006). "Gastrointestinal failure in intensive care: a retrospective clinical study in three different intensive care units in Germany and Estonia." *BMC Gastroenterol* **6**: 19.

**Rivier, J., J. Gulyas, et al.** (2007). "Stressin1-A, a potent corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1)-selective peptide agonist." *J Med Chem* **50**(7): 1668-74.

**Schmidt, R.F., Thews, G., Lang, F.** (2000) *Physiologie des Menschen*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 28. Auflage: 164, 349, 392ff, 811ff, 831ff.

**Skelton, K. H., M. J. Owens, et al.** (2000). "The neurobiology of urocortin." *Regul Pept* **93**(1-3): 85-92.

- Soderholm, J. D. and M. H. Perdue** (2001). "Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**(1): G7-G13.
- Stengel, A. and Y. Tache** (2009). "Neuroendocrine Control of the Gut During Stress: Corticotropin-Releasing Factor Signaling Pathways in the Spotlight." *Annu Rev Physiol* **71**: 219-39.
- Tache, Y.** (2004). "Corticotropin releasing factor receptor antagonists: potential future therapy in gastroenterology?" *Gut* **53**(7): 919-21.
- Tache, Y., V. Martinez, et al.** (2001). "Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**(2): G173-7.
- Tache, Y., V. Martinez, et al.** (2004). "CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome." *Br J Pharmacol* **141**(8): 1321-30.
- Trendelenburg P.** (1917). „Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik“ *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*; **81**:55-129.
- Waterman, S. A., M. Costa, et al.** (1994). "Accommodation mediated by enteric inhibitory reflexes in the isolated guinea-pig small intestine." *J Physiol* **474**(3): 539-46.
- Wenderoth, H.** (2002) „Wirkung des Benzodiazepins Midazolam auf die Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens in vitro“ Inaugural-Dissertation.
- Vale, W., J. Spiess, et al.** (1981). "Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin." *Science* **213**(4514): 1394-7.

## 8 Anhang

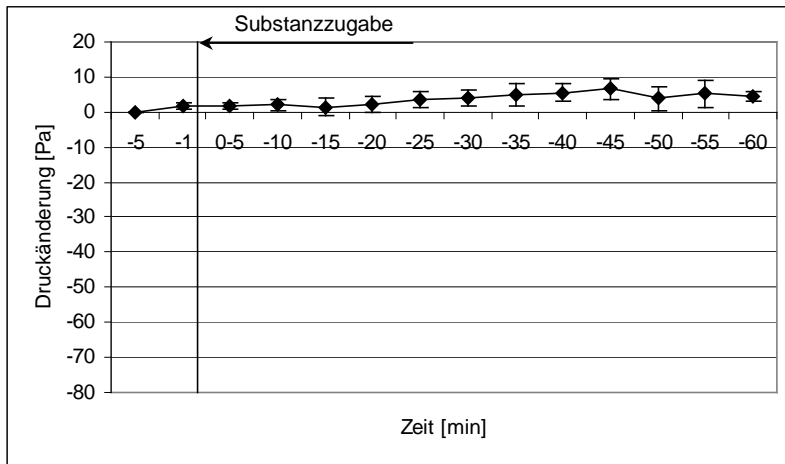


Abb. 55:  $\Delta$  PPT der Tyrodekontrolle zu Stressin

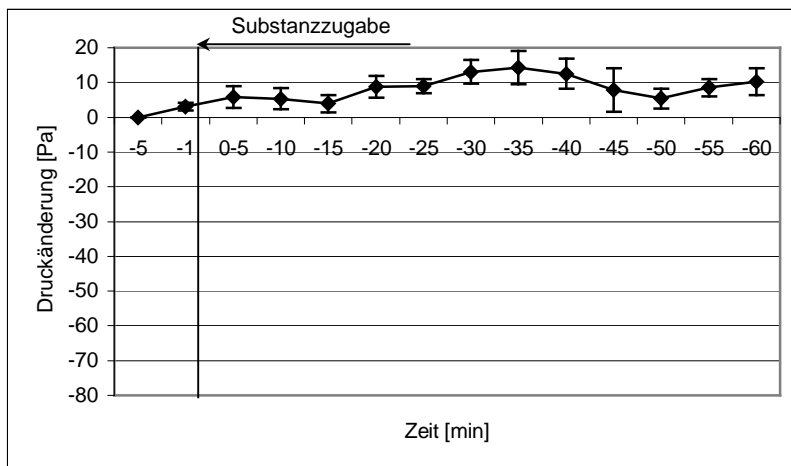


Abb. 56:  $\Delta$  PPT der Tyrodeontrolle zu Urocortin II

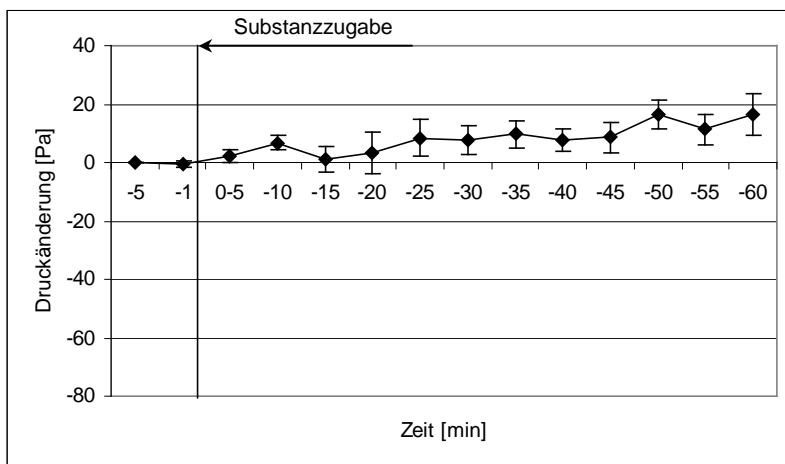
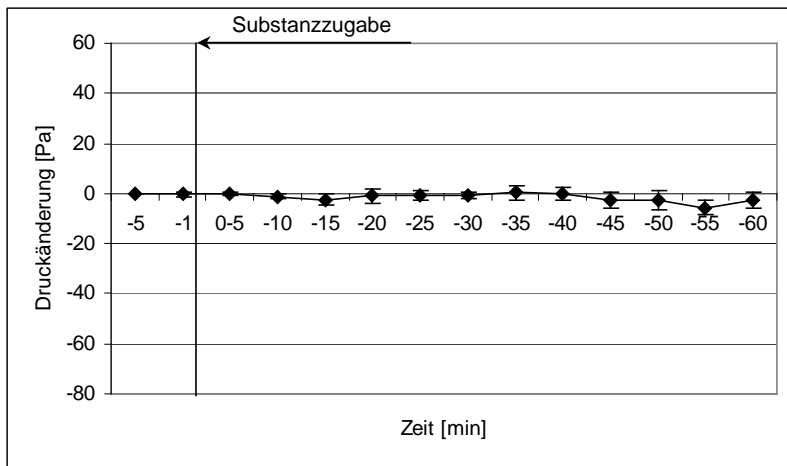
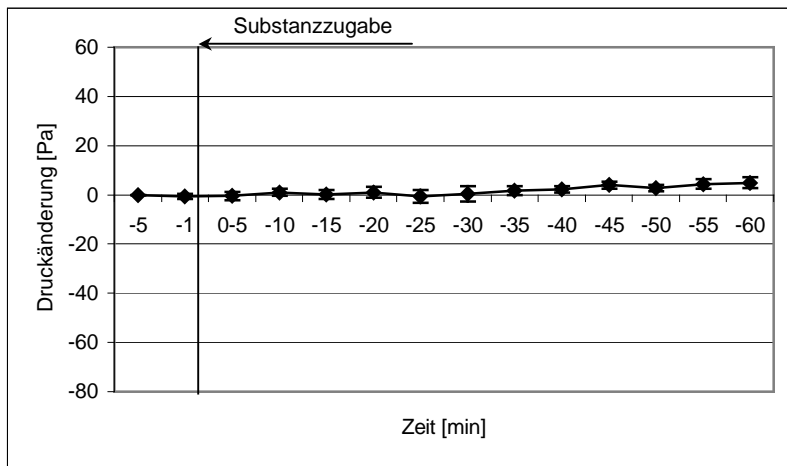


Abb. 57:  $\Delta$  PPT der Tyrodekontrolle zu Astressin

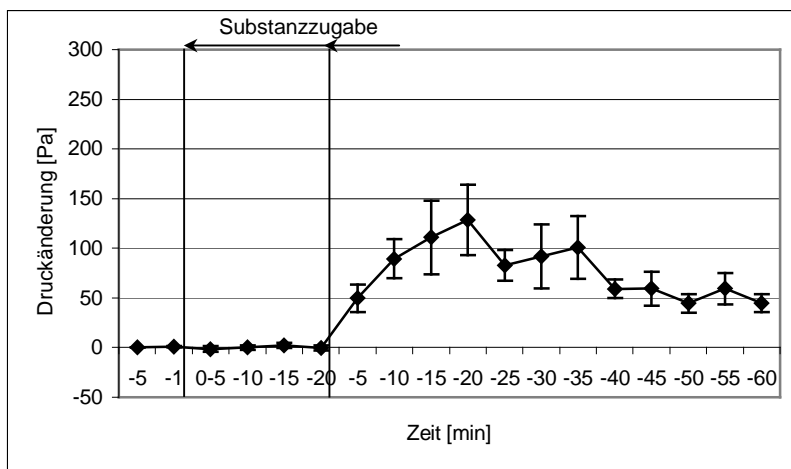




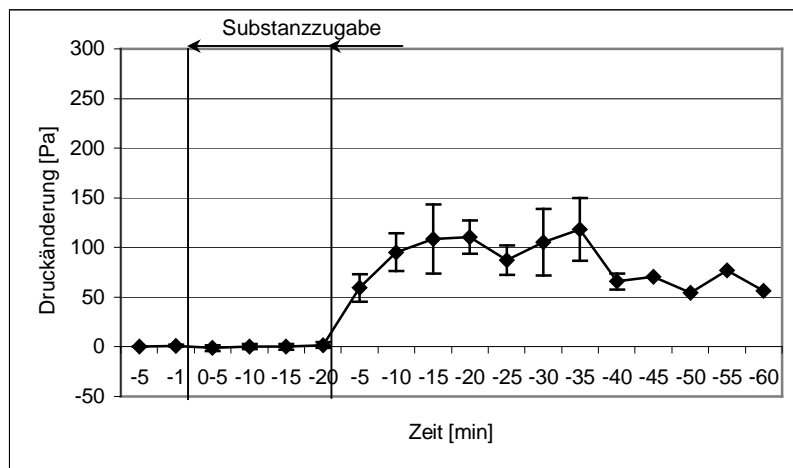
**Abb. 58:  $\Delta$  PPT der Tyrodekontrolle zu NBI 27914**



**Abb. 59:  $\Delta$  PPT der Tyrodekontrolle zu K 41498**



**Abb. 60:  $\Delta$  PPT der Tyrodelösung + Midazolam 10  $\mu$ M zu Stressin und Urocortin II**



**Abb. 61:  $\Delta$  PPT der Tyrodelösung + Midazolam 10  $\mu$ M zu NBI 27914 und K 41498**

**Tab. 19: Signifikanzniveaus der  $\Delta$  PPT nach 20 und 60 Minuten**

Substanz	Signifikanz p nach 20 Minuten	Signifikanz p nach 60 Minuten
(r/h)-CRF 1 nM	0,34	0,48
(r/h)-CRF 10 nM	0,08	0,26
(r/h)-CRF 100 nM	0,06	0,03
(r/h)-CRF 300 nM	0,01	0,02
Stressin 1 nM	0,38	0,62
Stressin 10 nM	0,90	0,64
Stressin 30 nM	0,01	0,04
Stressin 100 nM	0,01	0,10
Urocortin II 1 nM	0,21	0,14
Urocortin II 10 nM	< 0,00	< 0,00
Urocortin II 100 nM	0,01	0,01
Astressin 1 nM	0,46	0,27
Astressin 10 nM	0,61	0,74
Astressin 100 nM	0,49	0,30
NBI 27914 1 nM	0,22	0,18
NBI 27914 10 nM	0,01	0,01
NBI 27914 100 nM	0,52	0,35
K 41498 1 nM	0,41	0,39
K 41498 10 nM	0,58	0,14
K 41498 100 nM	0,66	0,59

<b>Substanz</b>	<b>Signifikanz p nach 20 Minuten</b>	<b>Signifikanz p nach 60 Minuten</b>
Astressin 100 nM und (r/h)-CRF 100 nM	0,74	0,44
NBI 27914 100 nM und Stressin 100 nM	0,26	0,35
K 41498 100 nM und Urocortin II 100 nM	0,99	0,63
(r/h)-CRF 1 nM und Midazolam 10 µM	0,71	0,44
(r/h)-CRF 10 nM und Midazolam 10 µM	0,56	0,73
Astressin 100 nM und Midazolam 10 µM	0,02	0,03
Urocortin II 1 nM und Midazolam 10 µM	0,08	0,03
Stressin 1 nM und Midazolam 10 µM	0,05	0,02
K 41498 100 nM und Midazolam 10 µM	0,80	0,19
NBI 27914 100 nM und Midazolam 10 µM	0,12	0,16

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. M. Herbert für die Überlassung des Themas bedanken. Auch möchte ich mich für die stets geduldige, spannende Zusammenarbeit und gute Betreuung im Labor und während der gesamten Zeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Kerstin Hoppe für die intensive/ ausdauernde Einarbeitung im Labor.

Einen besonderen lieben Dank möchte ich meiner Mutter und meinem Stiefvater dafür aussprechen, dass sie mich während meines Studiums unterstützt haben und in vielen Lebenslagen ein Anker waren. Ohne sie wäre mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Mutter für die grafische Unterstützung bedanken.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

---

Name	Karin Gudrun Höhn
Geburtsdatum/-ort	13.10.1981 in Nürnberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung:

---

09/1988 bis 07/1992	Volksschule Uttenreuth
09/1992 bis 07/1994	Emil-von-Behring-Gymnasium
09/1994 bis 06/2001	Gymnasium Höchststadt a. d. Aisch

## Hochschulbildung:

---

10/2001 bis 06/2008	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/2003	Physikum
06/2008	2. Staatsexamen

## Famulaturen:

---

03/2004	Allgemein-Chirurgie, Helmuth-G.-Walther-Krankenhaus
08/2005	Kardiologie, Hôpital Brabois adultes, Université Nancy 1 Henri Poincaré, Frankreich
09/2005	Kardiologie und Hämato-Onkologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/2006	Allgemeinmedizin, Allgemeinmedizinische Praxis, Höchststadt a. d. Aisch

## Praktisches Jahr:

---

02/2007 bis 01/2008	Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Neurologie, Chirurgie, Innere Medizin University of Stellenbosch, Südafrika: Innere Medizin
---------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Dissertation:

---

10/2004 bis 11/2010	Promotion bei Prof. Dr. med. M. Herbert in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Thema	<i>Der Einfluss von Corticotropin-Releasing-Factor auf die Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens in vitro</i>

## Berufliche Laufbahn:

---

Seit 07/2008	Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg
--------------	------------------------------------------------------------------------------------------------

Würzburg, Juni 2010

---

Höhn Karin