

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

Der Einfluss von Schwefelwasserstoff (H₂S) auf die Darmperistaltik.

Untersuchungen am Dünndarm des Meerschweinchens *in vitro*

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

vorgelegt von
Katja Carmen Engert
aus Dettelbach

Würzburg, Oktober 2011

Referent: Prof. Dr. med. Michael Herbert

Korreferent: Prof. Dr. med. Erhard Wischmeyer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2012

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	10
2.1	Versuchsaufbau	10
2.2	Versuchsablauf	12
2.3	Substanzen	14
2.3.1	L-Cystein.....	16
2.3.1.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von L- und D-Cystein	16
2.3.1.2	Antagonisierung der L-Cystein-Wirkung durch Cyanoalanin und Hydroxylamin	16
2.3.1.3	Aktivierung der H ₂ S-Biosynthese durch S-Adenosyl-L-Methionin	18
2.3.2	NaHS.....	19
2.3.2.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von NaHS	19
2.3.2.2	Antagonisierung der H ₂ S-Wirkung durch Naloxon, Apamin und Glibenclamid	19
2.3.2.3	Interaktion von NaHS, Midazolam und Fentanyl	20
2.4	Auswertung	21
2.5	Statistik	24
3	Ergebnisse	26
3.1	Wirkung von L-Cystein auf die Peristaltik des Dünndarms.....	26
3.1.1	Antagonisierung der L-Cystein-Wirkung durch Cyanoalanin und Hydroxylamin	29
3.1.2	Aktivierung der H ₂ S-Biosynthese durch S-Adenosyl-L-Methionin	31
3.2	Wirkung von NaHS auf die Peristaltik des Dünndarmes	32

3.2.1	Antagonisierung der H ₂ S-Wirkung	36
3.2.1.1	Blockade der Opioidrezeptoren mit Naloxon	36
3.2.1.2	Blockade der kalziumabhängigen Kaliumkanäle mit Apamin	36
3.2.1.3	Blockade der ATP-abhängigen Kaliumkanäle mit Glibenclamid	37
3.2.2	Interaktionen von H ₂ S und inhibitorisch wirksamen Pharmaka	38
3.2.2.1	Interaktion von NaHS und Midazolam	38
3.2.2.2	Interaktion von NaHS und Fentanyl	40
4	Diskussion	42
4.1	L-Cystein	43
4.2	H ₂ S	45
4.2.1	Wirkung über endogene opioiderge Mechanismen	46
4.2.2	Wirkung über kalziumabhängige Kaliumkanäle	47
4.2.3	Wirkung über ATP-abhängige Kaliumkanäle	48
4.2.4	Interaktion mit Midazolam	49
4.2.5	Interaktion mit Fentanyl	50
5	Zusammenfassung	52
6	Quellenverweis	54
6.1	Literaturverzeichnis	54
6.2	Internetverzeichnis	66
7	Anhang	67
7.1	Bezugsquellen	67

Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
CBS	Cystathionin β -Synthase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CSE	Cystathionin γ -Lyase
Δ PPT	Anstieg des Schwellendruckes
Fenta	Fentanyl
GABA	γ – Aminobuttersäure
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HA	Hydroxylamin
K _{ATP} -Kanäle	ATP-abhängige Kaliumkanäle
L-Cyst	L-Cystein
LM	Lösungsmittel / Tyrodelösung
Mida	Midazolam
n	Anzahl
NaHS	Natriumhydrogensulfid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAID	nichtsteroidales Antirheumatikum
ppm	parts per million
PPT	peristaltic pressure threshold, Schwellendruck
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
Tab.	Tabelle

1 Einleitung

Schon seit mehreren hundert Jahren ist Schwefelwasserstoff (H_2S) für seine Toxizität und seinen charakteristischen Geruch bekannt. Die Entdeckung der endogenen Produktion dieses Stoffes im menschlichen Körper war einer der Gründe für das steigende Interesse an der Entschlüsselung der physiologischen Funktionen des H_2S .

Schwefelwasserstoff ist ein farbloses, stark giftiges Gas, das bereits ab einem Schwellenwert von 0,002 bis 0,15 ppm durch seinen typischen Geruch nach faulen Eiern imponiert. Dieser entsteht durch die bakterielle Zersetzung von Proteinen, die aus schwefelhaltigen Aminosäuren bestehen. Als Folge einer zu hohen Exposition kommt es zur Schädigung der Geruchsempfindung, wodurch eine Konzentrationszunahme des Gases nicht mehr über den Geruch wahrgenommen werden kann [Internetquelle 1; Internetquelle 2].

In der Umwelt vorhandenes H_2S wird vom menschlichen Körper zum größten Teil über die Atemwege aufgenommen, ein kleiner Teil auch über die Haut. Durch seine starke Löslichkeit in lipophilen Lösungen besitzt H_2S eine gute Membrangängigkeit, die es ihm ermöglicht, durch Zellen zu diffundieren und so intrazelluläre Kompartimente zu erreichen. Diese Eigenschaft bedingt ein hohes Schädigungspotential auf den menschlichen Organismus. Durch eine Langzeiteinwirkung geringer Konzentrationen des Gases können allgemeine Symptome wie Schwindel, Kopfschmerzen, erhöhter Speichelfluss, Übelkeit, Schlafstörungen, Müdigkeit, Gedächtnisschwäche, Brechreiz, metallischer Geschmack, Diarrhoe, Appetitverlust oder Gewichtsabnahme auftreten. Weiterhin können starke Reizungen der Schleimhäute beobachtet werden [Internetquelle 1; Internetquelle 2]. Hohe Konzentrationen können zum vollständigen Atemstillstand durch zentrale Atemlähmung führen. Außerdem kann es zum Lungenödem

und durch die nichtoxidierte Form des H₂S zu Schäden im zentralen und peripheren Nervensystem kommen [Guidotti 1996; Milby & Baselt 1999; Internetquelle 2]. Eine Übersicht über die konzentrationsabhängigen Auswirkungen auf den Organismus liefert die nachfolgende Tabelle (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1: Konzentrationsabhängige Wirkung von H₂S auf den menschlichen Organismus [Internetquelle 2]

Wirkung
<ul style="list-style-type: none">• ab 20 ppm bei längerer Einwirkung: Hornhautschäden• um 100 ppm Reizempfindung an den Schleimhäuten des Auges und der Atemwege, Speichelfluss, Hustenreiz• > 200 ppm Atembeschwerden, Kopfschmerz• > 300 ppm Brechreiz• um 500 ppm Kraftlosigkeit, Benommenheit, Schwindel• > 500 ppm Krämpfe, Bewusstlosigkeit
Toxische Symptome
<ul style="list-style-type: none">• < 100 ppm nach mehreren Stunden Einwirkzeit• > 100 ppm innerhalb einer Stunde• 500 ppm lebensgefährlich in 30 Min• 1000 ppm in wenigen Minuten• 5000 ppm tödlich in wenigen Sekunden

Neben dem exogen in der Umwelt vorkommenden Schwefelwasserstoff wird dieser im menschlichen Körper auch endogen produziert. Die unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen entstandenen H₂S-Konzentrationen liegen dabei weit unterhalb toxischer Werte.

Die nach heutigem Kenntnisstand wichtigste Quelle des endogenen H₂S findet sich, vermittelt durch die beiden Enzyme Cystathionin β-Synthase (CBS) und Cystathionin γ-Lyase (CSE), im Rahmen des L-Cystein-Metabolismus.

Die Enzyme CBS und CSE werden im Zytosol produziert und benutzen Pyridoxal 5`-Phosphat (Vitamin B₆) als Koenzym [Stipanuk & Beck 1982] (vgl. Abb. 1).

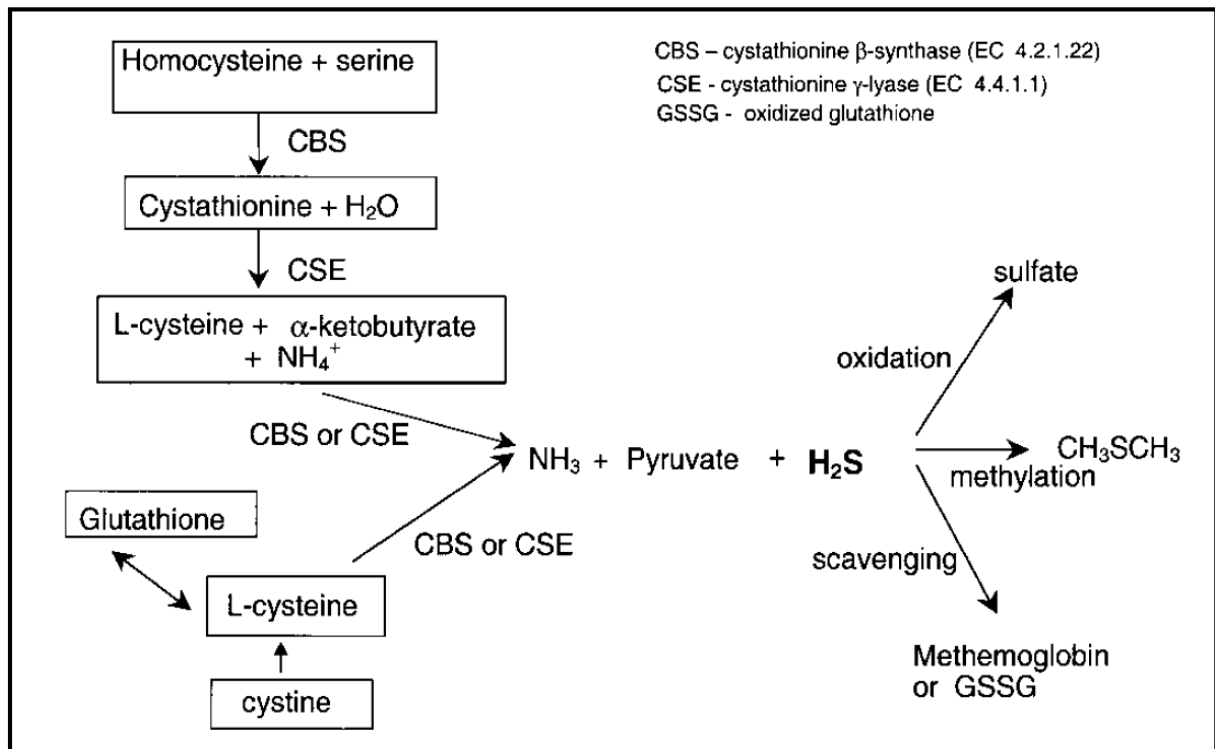


Abbildung 1 : Endogene enzymatische Produktion und Metabolismus von H₂S [Original übernommen von Wang 2002]

H₂S, als Endprodukt dieser Reaktion, übt mittels negativem Feedback eine entsprechende Rückkopplung auf die Enzyme CSE und CBS aus, so dass die Enzymaktivität einem gewissen Kontrollmechanismus unterliegt [Kredich et al. 1973].

Das Vorkommen von CSE und CBS wurde in verschiedenen Säugetiergeweben nachgewiesen, wobei sich eine gewebespezifische Verteilung erkennen lässt. So findet die hauptsächliche Expression von CSE in vaskulären und nichtvaskulären glatten Muskelzellen sowie im kardiovaskulären System statt. Ebenfalls konnte eine Aktivität dieses Enzyms in geringerem Ausmaß im Magen und

Dünndarm von Nagetieren gemessen werden [Lu et al. 1992; Levonen et al. 2000]. In sehr geringen Mengen findet auch im Gehirn von Ratten eine Expression des Enzymes CSE statt [Awata et al. 1993; Nishi et al. 1994]. Hingegen ist CBS bei Ratten das dominierende Enzym für die H₂S-Produktion im Gehirn und im Zentralnervensystem und ist zudem in hohen Konzentrationen im Nieren- und Lebergewebe zu finden [Abe & Kimura 1996; Hosoki et al. 1997; Meier et al. 2001]. Diese spezifische Verteilung bedeutet aber nicht, dass in den verschiedenen Geweben jeweils nur eines der beiden Enzyme vertreten ist. In einigen Organen, wie Leber, Nieren und Darm, konnten beide Enzyme nachgewiesen werden [Hosoki et al. 1997; Wang 2002].

In den letzten Jahren wurde dem Gas mehr und mehr eine entscheidende Rolle bei Steuerung und Regulierung verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in unterschiedlichsten Geweben und Organen zugeschrieben. Abhängig von Konzentration und Entstehungsbedingungen kann H₂S zum Teil völlig gegensätzliche Effekte hervorrufen. Besonders deutlich zeigt sich diese Tatsache in der Fähigkeit von H₂S inflammatorische Prozesse zu regulieren. Während es auf der einen Seite Entzündungen fördert und an zahlreichen pathologischen Vorgängen beteiligt ist, wie z.B. dem septischen oder hämorrhagischen Schock oder auch Pankreatitis, wirkt es auf der anderen Seite antiinflammatorisch [Bhatia et al. 2005; Li et al. 2005; Li et al. 2006; Distrutti et al. 2006a; Fiorucci et al. 2006; Zanardo et al. 2006; Hu et al. 2007; Wallace et al. 2007b; Mok & Moore 2008]. Seine entzündungshemmende Wirkung vermittelt es beispielsweise über eine Modulation der Leukozytenmigration und -adhäsion und über eine Beeinflussung der Neutrophilenfunktion. Einen detaillierten Überblick über die verschiedenen antiinflammatorischen Effekte von H₂S liefert die folgende Abbildung (siehe Abb. 2).

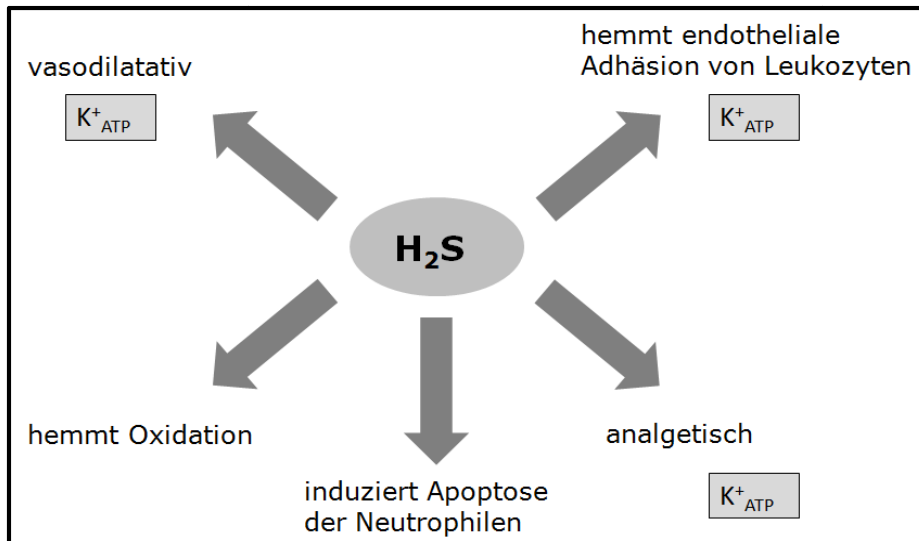


Abbildung 2: Antiinflammatorische Effekte von H₂S [modifiziert nach Fiorucci et al. 2006]

H₂S dient außerdem als nozizeptiver Botenstoff [Distrutti et al. 2006a; Kawabata et al. 2007], hat Einfluss auf die Regulierung der Expression verschiedener Gene [Khan et al. 1990; Mancardi et al. 2009] und ist beteiligt an Prozessen wie Kardioprotektion [Sivarajah et al. 2006; Johansen et al. 2006; Elrod et al. 2007] und Vasorelaxation [Hosoki et al. 1997; Zhao et al. 2001; Zhao & Wang 2002]. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass H₂S nicht nur die glatten Muskelzellen in Blutgefäßen zu entspannen vermag, sondern auch jene im Magen-Darm-Trakt [Hosoki et al. 1997]. Dies könnte ein erster Hinweis für eine physiologische Rolle des Gases in der Steuerung der intestinalen Motilität sein [Teague et al. 2002]. Im Verdauungstrakt reguliert H₂S ferner den Blutfluss und den Ablauf entzündlicher Reaktionen und spielt eine wichtige Rolle in der Erhaltung der mukosalen Integrität [Fiorucci et al. 2006].

Seine Funktionen erfüllt H₂S über unterschiedliche Signaltransduktionswege. Obwohl die molekularen Mechanismen der Wirkweise des H₂S noch nicht bis ins letzte Detail aufgeschlüsselt

werden konnten, sind doch bereits verschiedene Angriffspunkte des Gases bekannt. So entfaltet H_2S zahlreiche seiner physiologischen Funktionen über die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen [Zhao et al. 2001; Cheng et al. 2004; Geng et al. 2004; Tang et al. 2005; Yang et al. 2005; Distrutti et al. 2006a,b; Xiao et al. 2006; Zanardo et al. 2006]. Eine direkte Stimulation dieser Kanäle durch H_2S in glatten Muskelzellen ist cGMP-unabhängig und resultiert in einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Exogenes H_2S ist in der Lage, sowohl die Kaliumströme einer ganzen Zelle, als auch die Aktivität einzelner K_{ATP} -Kanäle durch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit zu steigern, ohne die Leitfähigkeit der einzelnen Kanäle zu verändern [Tang et al. 2005]. Weitere Angriffspunkte des H_2S sind verschiedene Kalziumkanäle [Kawabata et al. 2007; Telezhkin et al. 2009] oder der NMDA-Rezeptor.

Da eine Vielzahl der verschiedenen Effekte von H_2S auf den Körper stark konzentrationsabhängig ist, kommt der Konstanthaltung dieser Konzentrationen eine sehr große Bedeutung zu. Auch wenn über die genauen Abbauwege des H_2S bisher nur wenig bekannt ist, konnten bereits interessante Kenntnisse über die Mechanismen gewonnen werden, die für gleichbleibende H_2S -Werte im Blutplasma verantwortlich sind. Verschiedene Mechanismen, wie Komplexbildung, Binden von freien Radikalen sowie Metabolisierung durch Oxidation (in Mitochondrien) und Methylierung (im Zytosol) ermöglichen es, auch nach systemischer Zugabe von H_2S -Donatoren den Plasmaspiegel weitgehend konstant zu halten. So wird gewährleistet, dass es nur selten und dann auch nur für kurze Zeit zu einem Überschreiten der physiologischen Werte kommt (siehe auch Abb.1). Beim Auftreten zu hoher Konzentrationen wird die Hauptmenge des H_2S über den Urin ausgeschieden. Auch ist bekannt, dass verschiedene Enzyme die Fähigkeit besitzen, H_2S an Hämoglobin zu

binden und es auf diesem Weg aus dem Gewebe zu entfernen [Wang 2002; Li et al. 2005; Fiorucci et al. 2007].

Mit jeder weiteren gewonnenen Kenntnis über die physiologischen Effekte und Wirkmechanismen von H₂S steigt die Chance, in Zukunft dieses Wissen heilbringend einsetzen zu können. Beispiel für einen vielversprechenden Ansatz in diese Richtung ist die Entwicklung von chemisch modifizierten nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAIDs). Diese setzen im Magen H₂S frei und können so die durch die COX-Hemmer verursachte Schädigung der Magenschleimhaut reduzieren. Dennoch hemmen sie die Synthese von Prostaglandinen und erzielen eine vergleichbare antiinflammatorische Wirkung [Coruzzi et al. 2007; Li et al. 2007; Wallace et al. 2007].

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von H₂S als weiteren wichtigen Regulationsmechanismus der intestinalen Peristaltik zu untersuchen. Der Begriff Peristaltik beschreibt hierbei das Vorhandensein von Kontraktionswellen, die sich von oral nach anal fortbewegen und dem Transport und der Durchmischung des Darminhaltes dienen. Diese Kontraktionen der Darmwand sind das Ergebnis einer koordinierten Aktion von exzitatorisch oder inhibitorisch wirkenden neuronalen Strukturen sowie von verschiedenen auf die glatte Muskulatur einwirkenden Transmittern. Einer dieser Überträgerstoffe ist H₂S. Daneben existieren verschiedene Mechanismen, die die Peristaltik zusätzlich beeinflussen. Einen Überblick über Einflussfaktoren mit entsprechender Wirkung liefert Abbildung 3.

Physiologisch Erkrankungen	Zusammensetzung der Nahrung Diabetische autonome Neuropathie Toxisches Megakolon Sklerodermie Phäochromozytom Hypoparathyroidismus Amyloidose Dystrophia myotonica
Traumen	Abdominalchirurgische Eingriffe Schädelhirntrauma Spinales Trauma
Prädisponierende Faktoren	Apoplex Habituelle Obstipation Laxantienabusus Chronischer Alkoholismus Nikotinkonsum
Allgemeine Faktoren	Immobilisierung Kolonisation mit pathogenen Keimen Bakterielle Überwucherung Hypoxie Beatmungstherapie Azidose Metabolische Alkalose Sympathikotonus Postaggressionsstoffwechsel
Medikamente	Peritonitis, Sepsis Opiate Phenothiazine Trizyklische Antidepressiva Benzodiazepine Barbiturate Katecholamine Diuretika Calciumantagonisten Clonidin

Abbildung 3: Inhibitorische Einflussfaktoren auf die Magen-Darm-Motilität [Herbert 2001]

Eine koordinierte Darmmotilität spielt eine entscheidende Rolle und eine Störung dieser Peristaltik birgt ernsthafte gesundheitliche Risiken für den Patienten und führt nicht selten zu schwerwiegenden Komplikationen. Umso wichtiger ist es, die möglichen Einflussfaktoren und Regulationsmechanismen dieser intestinalen Motilität aufzudecken und somit neue Therapiekonzepte zu ermöglichen. Die hier gewählte Versuchsanordnung (siehe 2.1 Versuchsaufbau) hat sich zur Messung der Wirkung verschiedener Mediatoren und Pharmaka auf die intestinale Motilität bewährt und wurde bereits in mehreren Studien verwendet [Bülbring et al. 1958; Costall et al. 1993; Holzer & Maggi 1994]. Die Applikation selektiver Antagonisten

und Agonisten verschiedener Mediatoren diente der Aufdeckung der Mechanismen, über die H₂S seine Effekte auf die intestinale Peristaltik vermittelt. In den vorliegenden Untersuchungen diente Natriumhydrogensulfid (NaHS) als H₂S-Donor [Hosoki et al. 1997; Geng et al. 2004; Distrutti et al. 2006].

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen wurden am Dünndarm erwachsener Meerschweinchen beiderlei Geschlechtes vorgenommen. Die zwischen 350 und 540 g schweren Tiere stammten aus einem BFA-Stamm (Charles River Wiga, Sulzfeld). Die Tötung der Tiere erfolgte durch die Betäubung durch Genickschlag und anschließende Eröffnung der Karotiden zum Ausbluten. Nach Inzision des Abdomens sowie des Peritoneums wurde der ileozökale Übergang aufgesucht und der Dünndarm ca. 10 cm weiter proximal mit einer Fadenligatur markiert. Distal der Ligatur wurde der Darm durchtrennt. Somit konnte die korrekte Platzierung der Segmente in den jeweiligen Organbädern sichergestellt werden und ein orthograde Peristaltikreflex, von oral nach aboral, ausgelöst werden. Von Ileum und Jejunum wurden *in toto* das Mesenterium möglichst darmnah herauspräpariert und der Darmabschnitt entnommen. Der Darm wurde sofort in eine auf 37 °C vorgewärmte Tyrodelösung eingelegt, wo er bis zur weiteren Verwendung verblieb. Diese Lösung enthielt 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,0 mM MgCl₂, 11,9 mM NaHCO₃, 0,4 mM NaH₂PO₄ sowie 5,6 mM Glucose und wurde durch Begasung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂; 1,8 l/min) oxygeniert.

Der Dünndarm wurde anschließend in durchschnittlich 6 Segmente von je ca. 10 cm Länge unterteilt.

Für die Untersuchungen zur Dünndarmperistaltik *in vitro* diente ein langjährig bewährter Versuchsaufbau [Bülbring et al. 1958; Costall et al. 1993; Holzer & Maggi 1994]. Diese Versuchsanordnung bestand aus 5 Organbädern, jeweils gefüllt mit 30 ml Tyrodelösung, welche kontinuierlich oxygeniert wurden. Die Temperatur wurde konstant bei 37 °C gehalten.

Die einzelnen Segmente wurden mit ihrem oralen Ende an einem Zulauf (Glasröhrchen) befestigt, der aborale Teil an einem sich in zwei Schenkel teilenden Ablauf. Diese mit den Darmsegmenten bestückten Bauteile konnten nun horizontal in die vorbereiteten Organbäder eingesetzt und die Röhrchen an das Perfusionssystem angeschlossen werden. So erlaubte es die Versuchsanordnung bis zu 5 Experimente zur gleichen Zeit laufen zu lassen. Über die mit dem oralen Darmende verbundene Zuleitung war es mit einer vorgeschalteten Rollerpumpe möglich, eine kontinuierliche Perfusion (0,5 ml/min) des Darmlumens zu erzeugen (vgl. Abb. 4). Hierbei war die Pumpe zunächst an ein Vorratsgefäß mit Tyrodelösung angeschlossen, das für die Perfusionsversuche durch verschieden konzentrierte NaHS-Lösungen ausgetauscht werden konnte. Am Y-förmigen Abflussröhrchen führte ein Schenkel zu einem Druckaufnehmer, der die intraluminalen Druckänderungen während der peristaltischen Kontraktionen registrierte. Diese Daten wurden mittels Verstärker an einen 6-Kanalschreiber und einen PC übermittelt, die ihrerseits die Druckänderungen aufzeichneten.

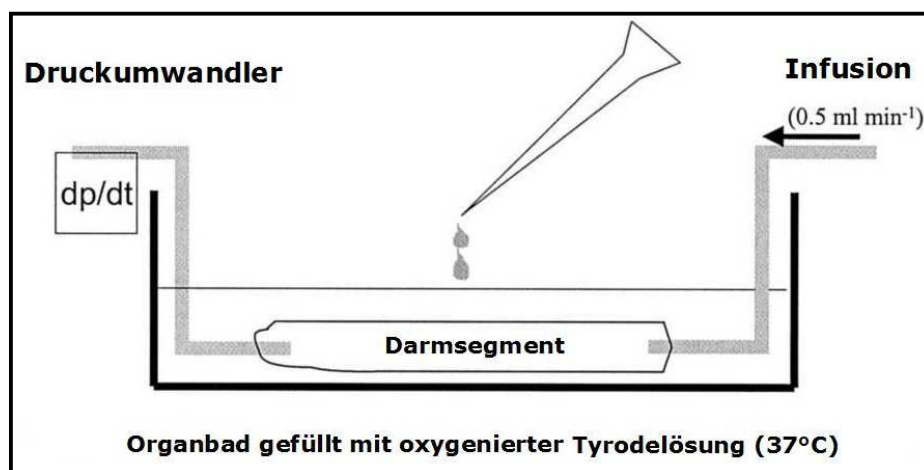


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung [modifiziert nach Herbert et al. 2002b]

Der andere, senkrecht stehende Schenkel des Abflussröhrchens endete 4 cm oberhalb des Darmsegmentes im jeweiligen Organbad. Über diesen konnte sich die durch die Peristaltik angetriebene intraluminale Flüssigkeit entleeren. Der auf diese Weise erzeugte Widerstand von 400 Pascal (Pa) (entspricht dem Druckgradienten von 4 cm Wassersäule) erlaubte zusammen mit der kontinuierlichen Perfusion von 0,5 ml/min eine allmähliche Füllung des Darmlumens und dadurch eine intraluminale Drucksteigerung. Nach Erreichen eines bestimmten Schwellendruckes (peristaltic pressure threshold, PPT) wurde eine nach aboral gerichtete peristaltische Bewegung ausgelöst.

Mit Hilfe des PCs und des 6-Kanalschreibers konnten die peristaltischen Wellen als spikeförmige Druckerhöhungen aufgezeichnet werden. Das ermöglichte eine Analysierung des zeitlichen Verlaufes der Reaktionen sowie eine exakte Bestimmung des jeweiligen Schwellendruckes und der Frequenz (siehe auch *2.4 Auswertung*).

2.2 Versuchsablauf

Nach Einbringen eines Darmsegmentes in das Organbad verblieb der Darmabschnitt in den ersten 10 min in Ruhe. Es erfolgte in dieser Phase noch keine Perfusion und das senkrechte Abflussröhrchen befand sich auf dem Niveau des Segmentes, es lag demzufolge kein Druckgradient vor (0 Pa).

Anschließend wurde eine kontinuierliche intraluminale Perfusion mit Tyrodelösung durchgeführt. Nach 10 min erfolgte ein erstes behutsames Durchspülen des Segmentes und nach weiteren 10 min ein Austausch der Tyrodeflüssigkeit im Organbad (30 ml) sowie ein erneutes Durchspülen, um eventuell noch vorhandene Luftblasen oder Darminhalt zu entfernen. Nach einer erneuten Wartezeit von 5 min wurde der Ablauf um 4 cm angehoben, wodurch das Druckniveau der Versuchsvorrichtung auf 400 Pa anstieg. Dies gewährleistete den

nötigen intraluminalen Druck zur Entstehung von peristaltischen Kontraktionen. Durch die kontinuierliche Perfusion mit Tyrodelösung kam es zur allmählichen Füllung des Darmlumens bis zum Erreichen des Schwellendruckes und folglich zur aboral gerichteten peristaltischen Kontraktion.

Zu diesem Zeitpunkt wurden jeweils die Registrierungen am 6-Kanalschreiber und am PC gestartet. Nun galt es abzuwarten, bis sich das Segment an die veränderten Druckverhältnisse anpasste und eine gleichmäßige Peristaltik entwickelte. Besondere Beachtung wurde hierbei auf eine konstante Höhe der Schwellenwerte sowie des nach der Kontraktion verbleibenden intraluminalen Druckes gelegt. Auch eine gleichmäßige Frequenz der peristaltischen Kontraktionen war eine wichtige Vorbedingung. Bevor mit den Zugaben der zu prüfenden Substanzen begonnen werden konnte, mussten stets mindestens fünf derartig gleichmäßige Kontraktionen aufgezeichnet werden.

Die zu testenden Pharmaka wurden extraserosal in das Organbad pipettiert, beziehungsweise bei den NaHS-Perfusionsversuchen mittels Rollerpumpe durch das Darmlumen perfundiert. Das extraserosal zugegebene Volumen betrug maximal 1% des Gesamtvolumens des Organbades. Die Applikationen erfolgten als Einzel- oder Zweitapplikationen, wobei die Auswirkungen der Substanzen auf die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet wurden. Falls eine zweite Substanz zugegeben wurde, so erfolgte dies nach einem Zeitintervall von 20 min, bei einzelnen Versuchsreihen auch erst nach 30 min. Als Kontrollsubstanz beziehungsweise Lösungsmittel (LM), wurde Tyrodelösung verwendet, die selbst keinen Effekt auf die Peristaltik hatte. Die jeweiligen Applikationszeitpunkte, Substanzkombinationen und -konzentrationen wurden im Versuchsprotokoll notiert. Die Testung von Substanzen oder Substanzkombinationen erfolgte an je 6 - 11 Darmsegmenten.

Diese Segmente wurden von unterschiedlichen Versuchstieren und von verschiedenen Abschnitten des Dünndarmes, von proximal bis distal, entnommen.

Die Versuche wurden jeweils 60 min nach der letzten Substanzapplikation beendet. Die Perfusion wurde abgestellt und eine Systemkalibrierung durchgeführt. Ziel dieser Kalibrierung war es, die Messwerte [mm] der peristaltischen Kontraktionen in Druckwerte [Pa] umzurechnen. Hierzu wurden zwei Referenzpunkte festgelegt. Der erste entsprach dem Niveau des Darmsegmentes im Organbad (Nullwert, 0 Pa), der zweite dem Druck der Wassersäule 4 cm über dem Niveau des Segmentes (400 Pa).

2.3 Substanzen

Einleitend zu folgendem Kapitel werden die in den Versuchen verwendeten Substanzen tabellarisch aufgelistet. Neben einer Charakterisierung der jeweiligen Funktion werden hier auch die applizierten Konzentrationen der Stoffe zusammengefasst (siehe Tab. 2). Die Bezugsquellen der Substanzen sind im Anhang zu finden.

Tabelle 2: Darstellung der verwendeten Substanzen mit Angabe der jeweiligen Funktion sowie der getesteten Badkonzentration

Substanz	Funktion	Konzentration
Apamin	Antagonist an <i>low conductance</i> kalziumabhängigen Kaliumkanälen	0,5 µM
Cyanoalanin	Hydrogensulfid-Synthetaseblocker (CSE-non brain)	1 µM, 10 µM
D-Cystein	inaktives Enantiomer	10 mM

Substanz	Funktion	Konzentration
Fentanyl	Synthetischer Opioidagonist, hohe Affinität zu μ -Rezeptoren	3 nM, 30 nM
Glibenclamid	Antagonist an ATP-abhängigen Kaliumkanälen	10 μ M
Hydroxylamin	Hydrogensulfid-Synthetaseblocker (CBS-brain)	10 μ M, 100 μ M
L-Cystein	Aminosäure im H_2S -Stoffwechsel, aktives Enantiomer	1 mM, 3 mM, 10 mM
Midazolam	Benzodiazepin	10 μ M, 30 μ M, 100 μ M
Naloxon	spezifisch-kompetitiver Opioidantagonist, hohe Affinität zu μ -Rezeptoren	0,5 μ M
Natriumhydrogensulfid	H_2S -Donor	100 μ M, 1 mM, 3 mM, 10 mM
S-Adenosyl-L-Methionin	Hydrogensulfid-Synthetaseaktivator (CBS-brain) / allosterischer Aktivator von CBS	10 μ M
Tyrodelösung	Lösungsmittel / Vergleichslösung	30 μ l

2.3.1 L-Cystein

2.3.1.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von L- und D-Cystein

Nach einer Vorlaufphase von 10 min wurden die Substanzen in den unten genannten Konzentrationen in die entsprechenden Organbäder appliziert. Die Versuche mit L-Cystein erfolgten, bei einer Konzentration von 1 mM und 3 mM, an je 9 Darmsegmenten. Bei 10 mM wurden 10 Segmente getestet. 10 mM D-Cystein wurde zu 6 Segmenten appliziert. Die Peristaltik wurde anschließend für jeweils 60 min aufgezeichnet (siehe Tab. 3).

Tabelle 3: Darstellung der Versuchsreihen mit L- und D-Cystein

10 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	1 mM L-Cystein	n=9
Vorlauf	3 mM L-Cystein	n=9
Vorlauf	10 mM L-Cystein	n=10
Vorlauf	10 mM D-Cystein	n=6

2.3.1.2 Antagonisierung der L-Cystein-Wirkung durch Cyanoalanin und Hydroxylamin

Zunächst wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um eventuell vorhandene Eigenwirkungen der applizierten Hydrogensulfid-Synthetaseblocker aufzudecken. Zu diesem Zweck wurde nach zehnminütigem Vorlauf Cyanoalanin (CA) in den Konzentrationen 1 und 10 μ M in 6 bzw. 8 Organbäder appliziert. Die Zugabe von Hydroxylamin (HA) erfolgte in den Konzentrationen 10 und 100 μ M in je 6 Organbäder. Nach weiteren 20 min wurde Tyrodelösung

zugegeben und anschließend die Peristaltik für jeweils 60 min registriert (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4: Darstellung der Versuchsreihen mit Hydrogensulfid-Synthetaseblockern (I)

10 min	20 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	1 μ M Cyanoalanin	Tyrodelösung	n=6
Vorlauf	10 μ M Cyanoalanin	Tyrodelösung	n=8
Vorlauf	10 μ M HA	Tyrodelösung	n=6
Vorlauf	100 μ M HA	Tyrodelösung	n=6

In den nachfolgenden Versuchen wurde der Einfluss der Hydrogensulfid-Synthetaseblocker auf die inhibitorische Wirkung des L-Cysteins untersucht. In Kontrollexperimenten wurden zu 8 bzw. 7 Segmenten nach einem Vorlauf von 10 min zunächst Tyrodelösung zugegeben, um dann nach 20 min L-Cystein in den Konzentrationen 3 bzw. 10 mM zu applizieren. Es folgte eine sechzigminütige Registrierung der Peristaltik.

In den anschließenden Experimenten wurde nach einem Vorlauf von 10 min zuerst ein Hydrogensulfid-Synthetaseblocker, Cyanoalanin (1 und 10 μ M) oder Hydroxylamin (10 und 100 μ M) appliziert. 20 min später erfolgte die Zugabe von L-Cystein in den Konzentrationen 3 und 10 mM. Nach dieser letzten Substanzapplikation wurde die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet. Es wurden jeweils 6 oder 7 Darmsegmente verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Darstellung der Versuchsreihen mit Hydrogensulfid-Synthetaseblockern (II)

10 min	20 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	Tyrodelösung	3 mM L-Cystein	n=8

10 min	20 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	10 µM Cyanoalanin	3 mM L-Cystein	n=7
Vorlauf	10 µM HA	3 mM L-Cystein	n=6
Vorlauf	100 µM HA	3 mM L-Cystein	n=7
Vorlauf	Tyrodellösung	10 mM L-Cystein	n=7
Vorlauf	1 µM Cyanoalanin	10 mM L-Cystein	n=7
Vorlauf	10 µM Cyanoalanin	10 mM L-Cystein	n=6
Vorlauf	10 µM HA	10 mM L-Cystein	n=6
Vorlauf	100 µM HA	10 mM L-Cystein	n=6

2.3.1.3 Aktivierung der H₂S-Biosynthese durch S-Adenosyl-L-Methionin

Nach einer Vorlaufphase von 10 min wurden die Darmsegmente für 20 min mit dem Hydrogensulfid-Synthetaseaktivator S-Adenosyl-L-Methionin (SAM, 10 µM) vorbehandelt. Anschließend wurden in einem Kontrollexperiment zu 7 Segmenten Tyrodellösung gegeben. Zu je 6 Segmenten wurden in weiteren Versuchen 1 und 3 mM L-Cystein appliziert. Die Peristaltik wurde anschließend für 60 min registriert (vgl. Tab. 6).

Tabelle 6: Darstellung der Versuchsreihen mit S-Adenosyl-L-Methionin

10 min	20 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	10 µM SAM	Tyrodellösung	n=7
Vorlauf	10 µM SAM	1 mM L-Cystein	n=6
Vorlauf	10 µM SAM	3 mM L-Cystein	n=6

2.3.2 NaHS

2.3.2.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von NaHS

Nach einem Vorlauf von 10 min wurde zu 7 Kontrollsegmenten nach Zeitintervallen von je 20 und 60 min Tyrodelösung zugegeben und die Peristaltik im Anschluss für 60 Minuten aufgezeichnet. 7 - 9 Segmente wurden nach zehnmütigem Vorlauf für 20 min mit Tyrodelösung vorbehandelt und anschließend mit unterschiedlich konzentrierten NaHS-Lösungen (100 μ M - 10 mM) perfundiert. Nach der letzten Substanzzugabe wurde die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min erfasst (siehe Tab. 7).

Tabelle 7: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

10 min	20 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	Tyrodelösung	Tyrodelösung	n=7
Vorlauf	Tyrodelösung	100 μ M NaHS	n=8
Vorlauf	Tyrodelösung	1 mM NaHS	n=7
Vorlauf	Tyrodelösung	3 mM NaHS	n=8
Vorlauf	Tyrodelösung	10 mM NaHS	n=9

2.3.2.2 Antagonisierung der H₂S-Wirkung durch Naloxon, Apamin und Glibenclamid

Nach einem Vorlauf von 10 min wurden die Darmsegmente für 20 min mit je einem der Antagonisten Naloxon (0,5 μ M), Apamin (0,5 μ M) oder Glibenclamid (10 μ M) vorbehandelt. Danach wurden 7 Darmsegmente mit 1 mM NaHS-Lösung perfundiert. An weiteren 7 bzw. 11 Segmenten erfolgte die Perfusion mit 3 mM NaHS und an 9 bzw. 10 Segmenten mit 10 mM NaHS. Ab Beginn der NaHS-Perfusion erfolgte eine Registrierung der Peristaltik für einen Zeitraum von 60 min (siehe Tab. 8).

Tabelle 8: Antagonisierung durch Naloxon, Apamin und Glibenclamid

10 min	20 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	0,5 µM Naloxon	1 mM NaHS	n=7
Vorlauf	0,5 µM Apamin	1 mM NaHS	n=7
Vorlauf	10 µM Glibenclamid	1 mM NaHS	n=7
Vorlauf	0,5 µM Naloxon	3 mM NaHS	n=7
Vorlauf	0,5 µM Apamin	3 mM NaHS	n=7
Vorlauf	10 µM Glibenclamid	3 mM NaHS	n=11
Vorlauf	0,5 µM Naloxon	10 mM NaHS	n=9
Vorlauf	0,5 µM Apamin	10 mM NaHS	n=10
Vorlauf	10 µM Glibenclamid	10 mM NaHS	n=9

2.3.2.3 Interaktion von NaHS, Midazolam und Fentanyl

Nach einem Vorlauf von 10 min wurden je 6 - 9 Segmente für 30 min entweder mit Tyrodelösung (Kontrolle) oder 100 µM NaHS perfundiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Tyrodelösung (Kontrolle), Midazolam (10, 30 oder 100 µM) oder Fentanyl (3 oder 30 nM). Die Peristaltik wurde ab der letzten Substanzzugabe für 60 min aufgezeichnet (vgl. Tab. 9).

Tabelle 9: Interaktionen

10 min	30 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	100 µM NaHS	Tyrodelösung	n=8
Vorlauf	Tyrodelösung	10 µM Midazolam	n=6
Vorlauf	100 µM NaHS	10 µM Midazolam	n=9
Vorlauf	Tyrodelösung	30 µM Midazolam	n=7

10 min	30 min	60 min	Anzahl
Vorlauf	100 µM NaHS	30 µM Midazolam	n=9
Vorlauf	Tyrodelösung	100 µM Midazolam	n=8
Vorlauf	100 µM NaHS	100 µM Midazolam	n=7
Vorlauf	Tyrodelösung	3 nM Fentanyl	n=7
Vorlauf	100 µM NaHS	3 nM Fentanyl	n=6
Vorlauf	Tyrodelösung	30 nM Fentanyl	n=6
Vorlauf	100 µM NaHS	30 nM Fentanyl	n=7

2.4 Auswertung

Bereits 1917 zeigten Studien von Trendelenburg, dass sich eine peristaltische Kontraktion in zwei Phasen gliedert. In der ersten, der präparatorischen Phase, kommt es zu einer kontinuierlichen Füllung des Darmlumens. Hierbei steigt der intraluminale Druck linear bis zu einem bestimmten Schwellendruck (PPT) an. Ist dieser Druck erreicht, beginnt die zweite, die sogenannte Entleerungsphase. Hierbei kommt es zur Auslösung einer peristaltischen Kontraktion, der Druck im Darmlumen steigt spikeartig an und resultiert in einem Auswurf des Darmvolumens. Danach fällt der Druck im Darmlumen wieder auf seinen Ausgangswert zurück [Trendelenburg 1917].

Wurde zu Segmenten nur die Vergleichssubstanz Tyrodelösung appliziert, trat keine Veränderung der Druckschwelle ein. Diese Kurven dienten in den Versuchen als Kontroll- und Vergleichskurven. Die nachfolgenden Graphiken (vgl. Abb. 5 + 6) dienen der Veranschaulichung einer regelmäßigen peristaltischen Kontraktion. Während Abbildung 5 eine schematische Darstellung ist, handelt es sich bei Abbildung 6 um eine Originalregistrierung.

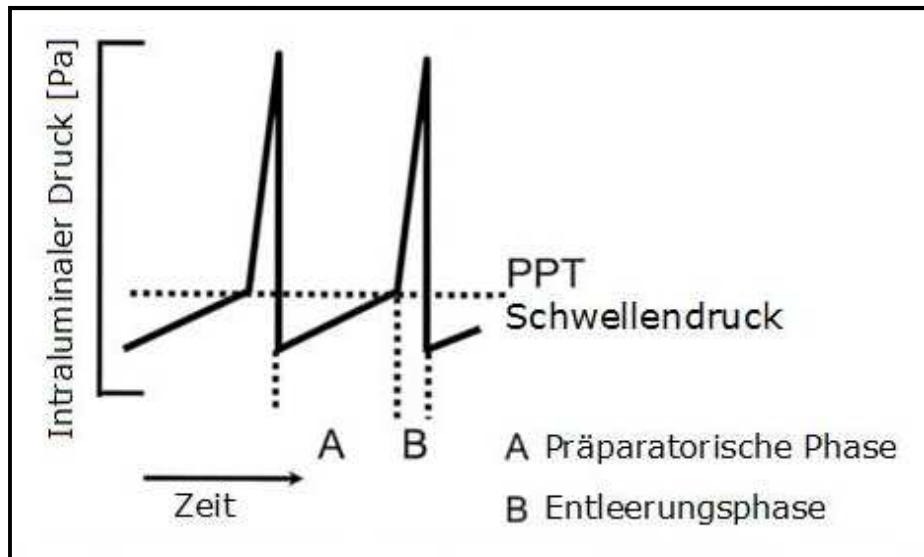


Abbildung 5: Schematische Darstellung der intraluminalen Druckänderungen im Verlauf peristaltischer Kontraktionen [modifiziert nach Herbert et al. 2002b]. In der präparatorischen Phase (A) nimmt der Druck im Darmlumen bis zum Erreichen eines definierten Schwellendruckes (PPT) zu. In der nachfolgenden Entleerungsphase (B) wird ein spikeartiger Anstieg des Druckes verzeichnet. Im Anschluss fällt der Druck im Darmlumen auf sein Ausgangsniveau zurück und die nächste präparatorische Phase setzt ein.

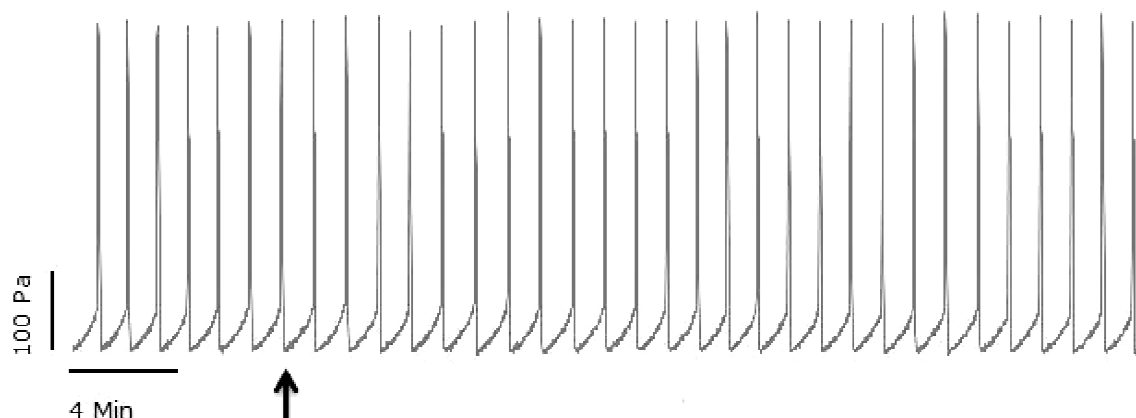


Abbildung 6: Originalregistrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] über einen Zeitraum von 60 min nach Applikation von 30 μ l Tyrodelösung bei einer zwanzigminütigen Vorbehandlung ebenfalls mit Tyrodelösung. Nach dem Auftreten von regelmäßigen Kontraktionen erfolgte die Zugabe

von 30 µl Tyrodelösung in das Organbad. 20 min später wurden weitere 30 µl Tyrodelösung appliziert. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der 2. Substanzzugabe. Bei den PPT-Werten war keine messbare Veränderung zu beobachten.

Als Parameter für die Auswertung der durchgeführten Versuchsreihen dient die Druckschwelle (PPT). Ein Anstieg der Druckschwelle deutet auf eine Inhibition der Peristaltik hin. Dabei kann es bis zur vollständigen Aufhebung der Darmmotilität kommen. Ein Absinken der PPT hingegen entspricht einem stimulierenden Effekt auf die Peristaltik [Costall et al. 1993; Holzer & Maggi 1994; Waterman & Costa 1994; Bartho & Holzer 1995; Holzer 1997; Holzer et al. 1997; Holzer et al. 1998].

Die Aufzeichnungen des 6-Kanalschreibers erlaubten ein Ausmessen der PPT. Hierfür wurde zunächst durch die Verlängerung der Kalibrierungs-Nulllinie die Grundlinie bestimmt. Nun konnten die Abstände der einzelnen Druckschwellen zu dieser Grundlinie in Millimetern gemessen werden. Durch die Versuchsanordnung wurden die Druckniveaus von 0 und 400 Pa festgelegt. So konnte zu jedem Versuchszeitpunkt der intraluminale Druck errechnet werden.

Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurde der Schwellendruck in 5-Minutenintervallen ausgewertet (0-5 min, 5-10 min, 10-15 min, ...), wobei jeweils die Druckschwelle der letzten vollständigen Kontraktion im jeweiligen 5-Minutenintervall ausgemessen wurde. Zur Festlegung eines Ausgangswertes wurden im Vorlauf die letzte und fünftletzte (-1 und -5) peristaltische Welle vor Applikation der Substanz gemessen. Der Mittelwert dieser beiden Messungen diente als Ausgangswert und wurde von den PPT-Werten der Messungen nach Substanzzugabe subtrahiert. Somit erhielt man die substanzspezifische Schwellenänderung Δ PPT. Wurden in einer Versuchsreihe zwei verschiedene Substanzen konsekutiv zugegeben, wurde die letzte gemessene PPT nach Zugabe der ersten Substanz

von der PPT nach Zugabe der zweiten Substanz abgezogen. So war eine Abgrenzung der Eigenwirkung der zuletzt zugeführten Substanz gegen die der Ersten möglich.

Stoffe mit inhibitorischer Wirkung induzierten in entsprechend hoher Konzentration das komplette Ausbleiben propulsiver Peristaltik. In Folge einer solchen kompletten Hemmung kam es zu einer maximalen Dilatation des Segmentes. Der intraluminale Druck stieg auf 400 Pa an. Unkoordinierte, lediglich segmental auftretende Muskelaktivitäten bei dilatiertem Darm, die zu keiner koordinierten Peristaltik oder Propulsion führten, wurden ebenfalls als komplette Hemmung bezeichnet. Traten im Anschluss erstmals wieder messbare peristaltische Kontraktionen auf, sprach man von Spontanaktivität. Definitionsgemäß hatten diese Kontraktionen eine Kontraktionsamplitude von mindestens 200 Pa und wiesen im Unterschied zur regelmäßigen Peristaltik keine präparatorische Phase und auch keine konstante Druckschwelle PPT auf.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Sigmastat 32 (Fa. SPSS Inc., Erkrath). Die PPT-Werte wurden mit dem Kolmogoroff-Smirnow-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) dargestellt. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte 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 $p < 0,05$ [Herbert et al. 2005].

Die Ergebnisse der Versuchsreihen wurden als Balkendiagramme mit zugehörigem Standardfehler dargestellt (Programm Sigmaplot 8.0,

Fa. SPSS Inc.). In den Graphiken wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollmessung mit „*“ markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von L-Cystein auf die Peristaltik des Dünndarms

Nach der Zugabe von L-Cystein, dessen Metabolismus maßgeblich zur endogenen H₂S-Produktion beiträgt, wurde jeweils in Zeitintervallen von 20 und 60 min nach der Applikation dessen Einfluss auf die Druckschwelle gemessen. So zeigte sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der PPT durch die Applikation von L-Cystein nach 20 und 60 min. Die Änderungen der PPT waren, vor allem in den Versuchen mit 10 mM L-Cystein, nach 20 min deutlich stärker. In diesem ersten Intervall stieg der Schwellendruck durchschnittlich um $234,6 \pm 34,0$ Pa an, während innerhalb der folgenden 60 min nur noch ein Anstieg um im Mittel $121,2 \pm 24,2$ Pa zu verzeichnen war. Bei den niedrigeren Konzentrationen sowie bei den Versuchen mit D-Cystein ließ sich eine Tendenz in diese Richtung erkennen, signifikante Unterschiede der PPT lagen allerdings nicht vor. Die folgenden Beschreibungen beziehen sich aufgrund des Versuchsaufbaus auf die Werte des zweiten Zeitintervalls.

Während es bei 1 mM und 3 mM L-Cystein lediglich zu unspezifischen Veränderungen kam, führten 10 mM zu einem Anstieg des Schwellendruckes um durchschnittlich $121,2 \pm 24,2$ Pa (vgl. Tab. 10 + Abb. 7).

Tabelle 10: Anstieg der PPT nach Applikation von L-Cystein in einem Zeitintervall von 20 bzw. 60 min

	Δ PPT [Pa] nach 20 min	Δ PPT [Pa] nach 60 min
L-Cystein 1 mM	$-5,2 \pm 3,8$	$-0,7 \pm 3,5$
L-Cystein 3 mM	$4,9 \pm 5,1$	$4,3 \pm 4,0$
L-Cystein 10 mM*	$234,6 \pm 34,0$	$121,2 \pm 24,2$

Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM, n = 9, *n = 10.

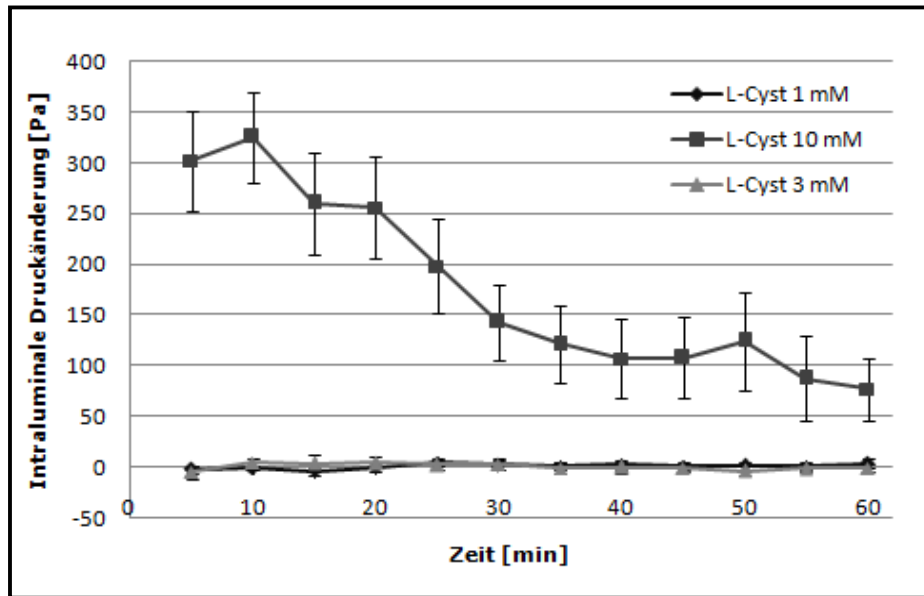


Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und zeitlicher Verlauf des PPT-Anstieges nach Applikation von 1 – 10 mM L-Cystein (L-Cyst). Die Aufzeichnung begann mit Substanzzugabe, woraufhin eine Registrierung der intraluminalen Druckverhältnisse für jeweils 60 min erfolgte. Die Symbole stehen für den Mittelwert des PPT-Anstieges [Pa] zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (standard error of the mean = SEM).

Weder 1 noch 3 mM L-Cystein bewirkten eine Hemmung der Peristaltik. Hingegen führte die Applikation von 10 mM L-Cystein bereits nach einer Minute bei 8 von 10 Segmenten zu einer kompletten Hemmung. An diesen Segmenten konnte nach durchschnittlich 23,9 min das Auftreten von Spontanaktivität beobachtet werden. Eine Erholung der Peristaltik in Form von regelhaften Kontraktionen war im Schnitt nach 28 min zu verzeichnen (vgl. Abb. 8).

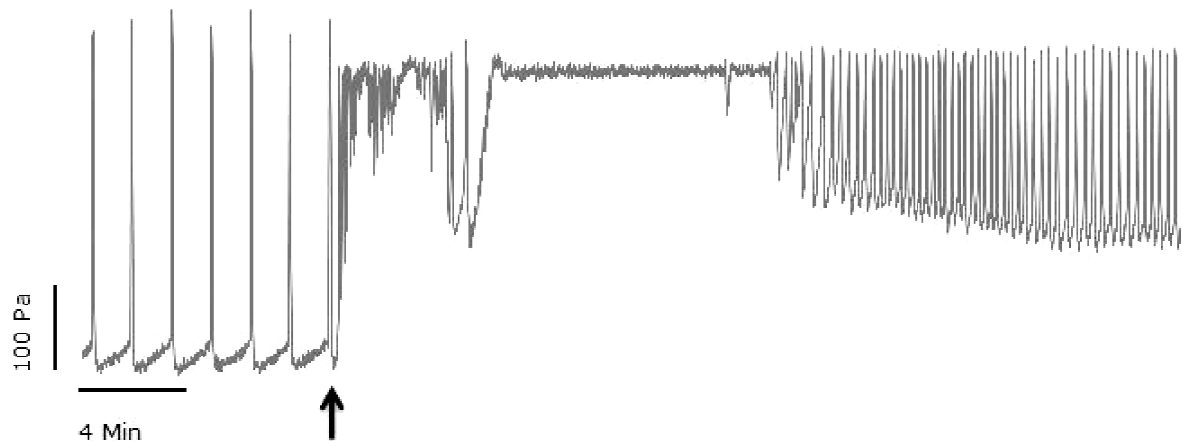


Abbildung 8: Originalregistrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] über einen Zeitraum von 60 min nach Applikation von 10 mM L-Cystein bei einer zwanzigminütigen Vorbehandlung mit Tyrodelösung. Nach dem Auftreten von regelmäßigen Kontraktionen erfolgte die Zugabe von 30 μ l Tyrodelösung in das Organbad. 20 min später wurden 10 mM L-Cystein appliziert, worauf ein unmittelbarer Anstieg der PPT bis hin zur kompletten Hemmung der peristaltischen Aktivität eintrat. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe von L-Cystein.

Auch die Zugabe des Enantiomeres D-Cystein (10 mM) rief einen Anstieg des Schwellendruckes um im Mittel $70,8 \pm 25$ Pa (nach 20 min), bzw. $37,9 \pm 17,4$ Pa (nach 60 min) hervor (siehe Tab. 11). Auffällig war die verhältnismäßig große Streuung der Werte, sowohl bei L-Cystein als auch bei D-Cystein (vgl. Tab. 10 und 11).

Tabelle 11: Anstieg der PPT nach Applikation von D-Cystein in einem Zeitintervall von 20 bzw. 60 min

	Δ PPT [Pa] nach 20 min	Δ PPT [Pa] nach 60 min
D-Cystein 10 mM	$70,8 \pm 25,0$	$37,9 \pm 17,4$

Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM, n = 6.

3.1.1 Antagonisierung der L-Cystein-Wirkung durch Cyanoalanin und Hydroxylamin

Um genauere Erkenntnisse der H₂S-Synthese aus Cystein zu erhalten, wurden Darmsegmente mit den Hydrogensulfid-Synthetaseblockern Cyanoalanin und Hydroxylamin vorbehandelt. Zunächst wurde Cyanoalanin, das am Enzym CSE angreift und Hydroxylamin, welches das Enzym CBS blockiert, auf eine mögliche Eigenwirkung auf die Peristaltik untersucht. Hierbei hatten 1 und 10 µM Cyanoalanin sowie 10 µM Hydroxylamin keine signifikante Auswirkung auf die Peristaltik. Die Zugabe von 100 µM Hydroxylamin führte hingegen im ersten Zeitintervall über 20 min zu einem Anstieg des Schwellendruckes um $50,0 \pm 24,5$ Pa (vgl. Tab. 12).

Tabelle 12: Anstieg der PPT nach Applikation von Cyanoalanin und Hydroxylamin bei Zugabe von Tyrodelösung nach 20 min in einem Messintervall von 20 bzw. 60 min

	Δ PPT [Pa] nach 20 min	Δ PPT [Pa] nach 60 min
Cyanoalanin 1 µM - Tyrodelösung	$4,9 \pm 3,6$	$-2,4 \pm 2,1$
Cyanoalanin 10 µM - Tyrodelösung*	$-0,8 \pm 2,7$	$2,6 \pm 5,1$
HA 10 µM - Tyrodelösung	$-5,8 \pm 4,4$	$-7,4 \pm 6,2$
HA 100 µM - Tyrodelösung	$50,0 \pm 24,5$	$-4,3 \pm 16,3$

Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM, n = 6, *n = 8.

Durch Blockade des Enzymes CSE durch Cyanoalanin, beziehungsweise CBS durch Hydroxylamin, konnte nach Applikation

von L-Cystein keine signifikante Reduktion des PPT-Anstieges gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden.

So kam es bei Applikation von 3 mM L-Cystein nach erfolgter Vorbehandlung mit jeweils 10 µM Cyanoalanin beziehungsweise Hydroxylamin zu keiner relevanten Veränderung der Druckschwelle. Eine Vorbehandlung mit 100 µM Hydroxylamin resultierte in einem leichten Anstieg der PPT (siehe Tab. 13). Allerdings liegt in dieser Versuchsreihe keine Normalverteilung der Messwerte vor.

Tabelle 13: Anstieg der PPT nach Applikation von L-Cystein in einem Messintervall von 60 min bei Vorbehandlung mit Tyrodelösung, Cyanoalanin oder Hydroxylamin

	ΔPPT [Pa]
Tyrodelösung – L-Cystein 3 mM**	15,4 ± 10,8
Cyanoalanin 10 µM - L-Cystein 3 mM	-5,2 ± 2,4
HA 10 µM - L-Cystein 3 mM*	-5,2 ± 13,8
HA 100 µM - L-Cystein 3 mM	40,6 ± 26,8

Die Werte entsprechen dem Mittelwert ± SEM, n = 7, *n = 6, **n = 8.

Eine ähnliche Reaktion war bei Zugabe von 10 mM L-Cystein nach Vorbehandlung mit Cyanoalanin beziehungsweise Hydroxylamin zu beobachten. Die Vorbehandlung mit Cyanoalanin verursachte keine Veränderung der PPT-Werte. Dagegen zeigte die Hydroxylaminzugabe tendenziell einen konzentrationsabhängig geringeren Anstieg der PPT nach 10 mM L-Cystein (vgl. Abb. 9). Da diese Daten ebenfalls keine Normalverteilung zeigen, liegen auch hier keine signifikanten Druckunterschiede vor.

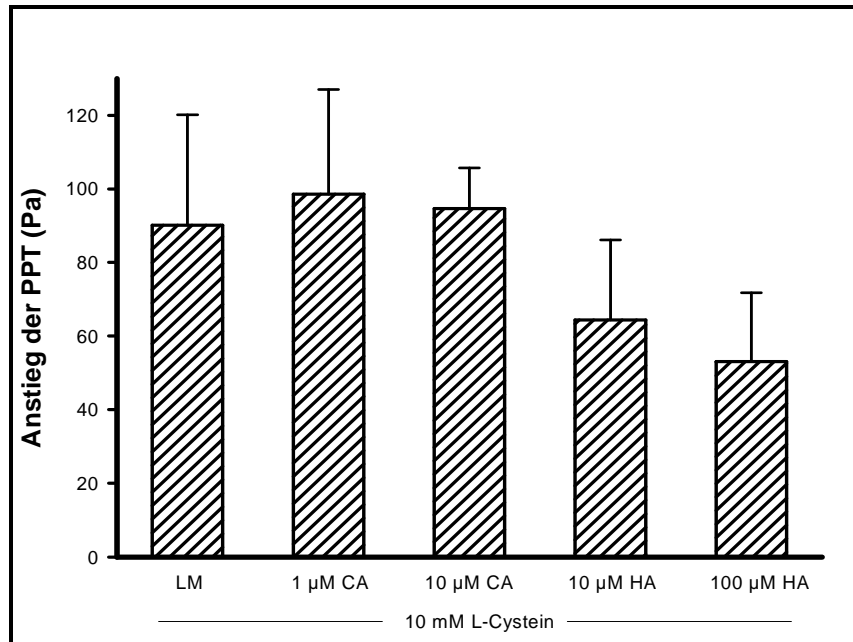


Abbildung 9: Einfluss einer Vorbehandlung mit Cyanoalanin (1 µM, 10 µM CA) bzw. Hydroxylamin (10 µM, 100 µM HA) auf den Anstieg der PPT durch 10 mM L-Cystein im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tyrodelösungsvorbehandlung, LM). Die Säulen stehen für den mittleren PPT-Anstieg [Pa], die Fehlerbalken für den Standardfehler, n=7. Bei Tyrodelösung - 10 mM L-Cystein und 1 µM CA – 10 mM L-Cystein n=6.

3.1.2 Aktivierung der H₂S-Biosynthese durch S-Adenosyl-L-Methionin

Durch den Hydrogensulfid-Synthetaseaktivator S-Adenosyl-L-Methionin (10 µM) konnte weder ein Einfluss auf die Peristaltik noch ein signifikanter Anstieg der durch L-Cystein induzierten PPT-Erhöhung ausgelöst werden (vgl. Tab. 14 und Abb. 10).

Tabelle 14: Anstieg der PPT nach Applikation von Tyrodelösung und L-Cystein in einem Zeitintervall von 60 min bei Vorbehandlung mit S-Adenosyl-L-Methionin

	ΔPPT [Pa]
SAM 10 µM – Tyrodelösung*	21,7 ± 20,5

SAM 10 μ M – L-Cystein 1 mM	14,9 \pm 11,9
SAM 10 μ M – L-Cystein 3 mM	19,2 \pm 9,7

Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM, n = 6, *n = 7.

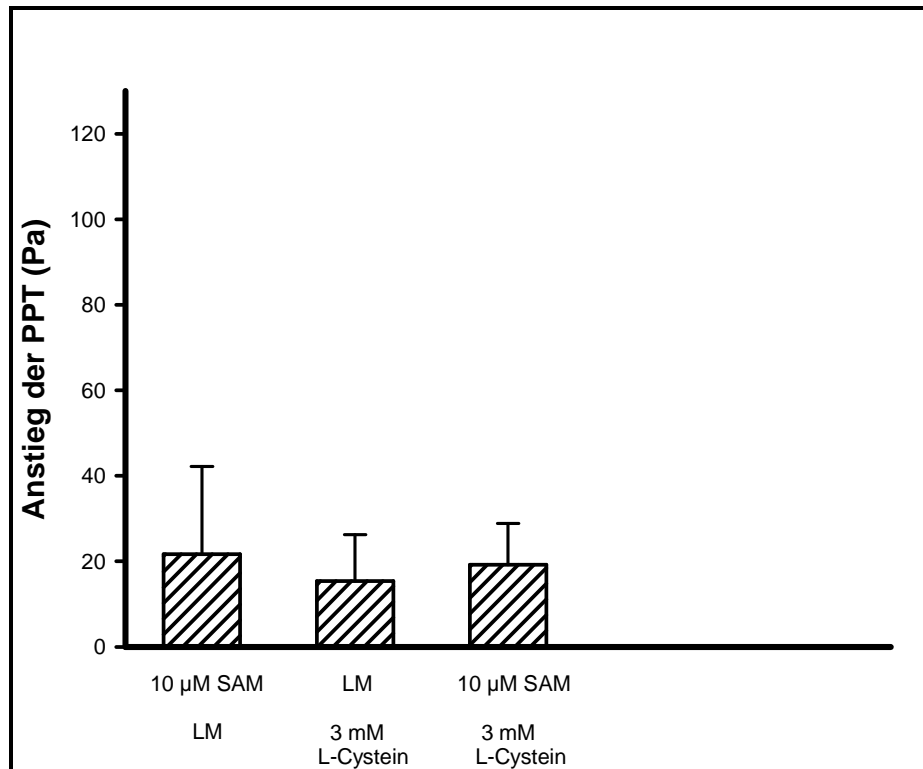


Abbildung 10: Einfluss der Vorbehandlung mit 10 μ M S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf den Anstieg der PPT durch 3 mM L-Cystein im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tyrodelösungsvorbehandlung, LM). Die Säulen stehen für den mittleren PPT-Anstieg [Pa], die Fehlerbalken für den Standardfehler, n=6. Bei SAM - Tyrodelösung n=7.

3.2 Wirkung von NaHS auf die Peristaltik des Dünndarmes

Durch die intraluminale Perfusion von 100 μ M NaHS wurde keine Veränderung der PPT gegenüber der mit Tyrodelösung perfundierten Kontrollgruppe festgestellt (2,4 \pm 7,3 Pa gegenüber -2,8 \pm 2,7 Pa). Hingegen kam es bei Perfusion mit 1, 3 und 10 mM NaHS konzentrationsabhängig zur Erhöhung der PPT um 9,2 \pm 4,9 Pa, 135,9 \pm 30,7 Pa und 225,6 \pm 26,0 Pa (siehe Abb. 11 und 12).

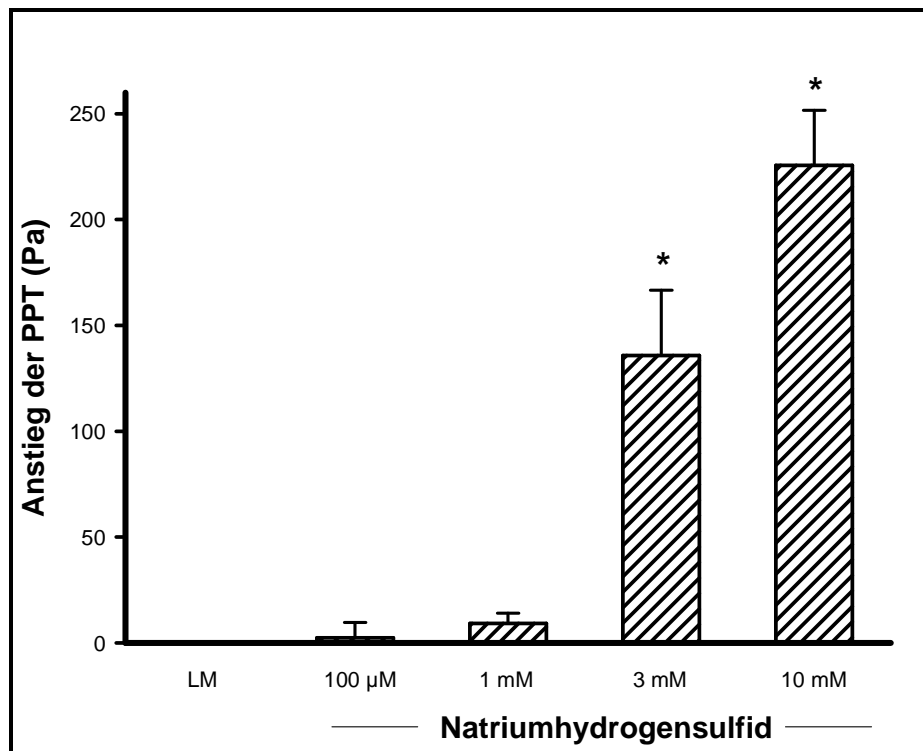


Abbildung 11: Konzentrationsabhängiger Anstieg der PPT durch endoluminale Perfusion von NaHS in den Konzentrationen 100 µM, 1 mM, 3 mM und 10 mM im Vergleich zur Tyrodelösung (LM). Die Säulen stehen für den mittleren PPT-Anstieg [Pa], die Fehlerbalken für den Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollmessung sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=7$. Bei Tyrodelösung - 100 µM NaHS und Tyrodelösung - 3 mM NaHS $n=8$, Tyrodelösung - 10 mM NaHS $n=9$.

Während eine Applikation von 3 mM NaHS in lediglich 5 von 8 Segmenten eine komplette Hemmung der Peristaltik induzierte, führte die Zugabe von 10 mM NaHS bei allen Segmenten ($n=9$) zu einem kompletten Ausfall der peristaltischen Aktivität nach durchschnittlich 18 min.

In Abbildung 13 wird außerdem der konzentrationsabhängige zeitliche Verlauf der intraluminalen Druckänderungen dargestellt. Während es bei 3 und 10 mM zu einem schnell einsetzenden, steilen Anstieg der Druckschwelle kam, war die PPT-Zunahme bei Zugabe von 1 mM

deutlich flacher. Nach Applikation von 10 mM NaHS kam es im beobachteten Zeitrahmen zu keiner Erholung der Peristaltik. Die Zugabe von 3 mM NaHS resultierte, im Gegensatz zu 10 mM, im Mittel in einem allmählichen Absinken der PPT. Somit konnte in einigen Segmenten das erneute Auftreten peristaltischer Kontraktionen beobachtet werden. Auch nach Zugabe dieser niedrigeren NaHS-Konzentration war bei einzelnen Segmenten eine komplette Hemmung festzustellen.

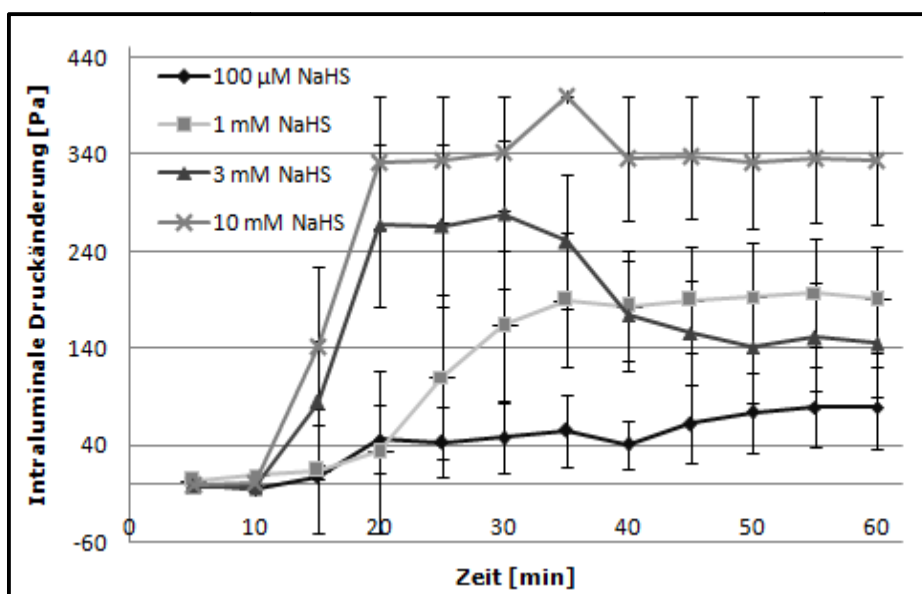
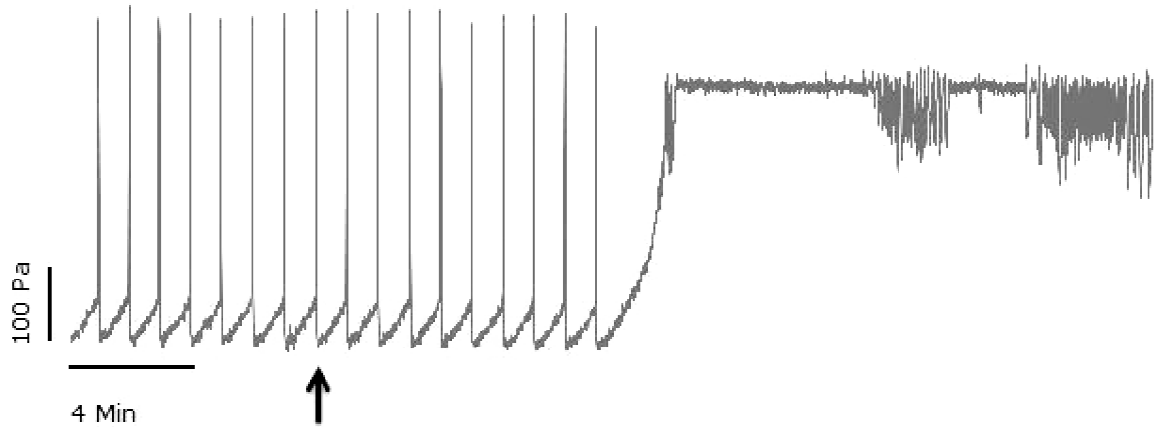


Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und zeitlicher Verlauf des PPT-Anstieges nach Applikation von 100 µM – 10 mM NaHS. Die Aufzeichnung begann mit Substanzzugabe, woraufhin eine Registrierung der intraluminalen Druckverhältnisse für jeweils 60 min erfolgte. Die Symbole stehen für den Mittelwert des PPT-Anstieges [Pa] zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In Abbildung 13 A und B sind exemplarisch zwei mögliche Reaktionen der Darmmotilität auf die Applikation von 3 mM NaHS dargestellt. Während in Abbildung 13 A eine komplette Hemmung mit völligem Ausbleiben peristaltischer Aktivitäten zu erkennen ist, zeigt das Segment in Abbildung 13 B nach einem 15 minütigen Ausfall erneut

Kontraktionen, wenn auch unregelmäßiger und mit erhöhten PPT-
Werten.

A



B

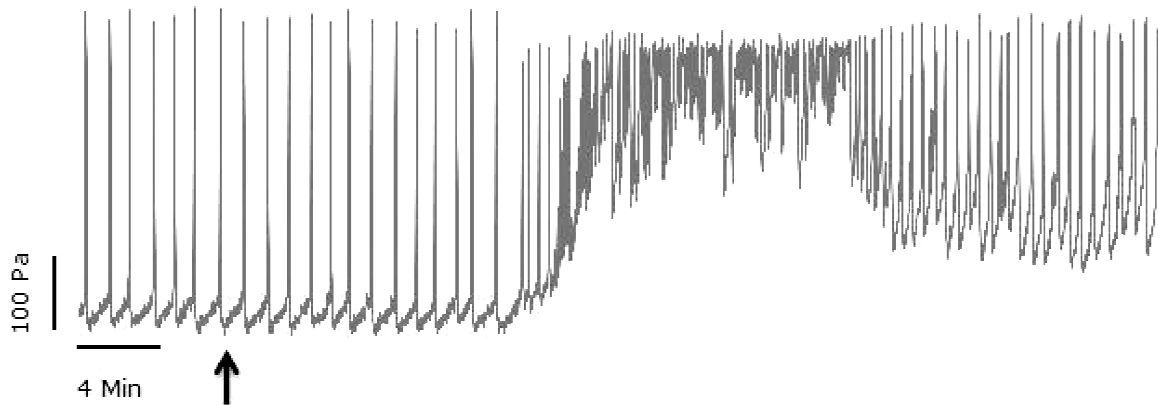


Abbildung 13 A und B: Originalregistrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] über einen Zeitraum von 60 min nach Applikation von 3 mM NaHS bei einer zwanzigminütigen Vorbehandlung mit Tyrodelösung. Nach dem Auftreten von regelmäßigen Kontraktionen erfolgte die Zugabe von 30 µl Tyrodelösung in das Organbad. 20 min später wurde der Perfusionszulauf auf 3 mM NaHS umgestellt, worauf ein Anstieg der PPT verzeichnet wurde. Während in Abb. 13 A ca. 13 min nach dem Start der

NaHS-Perfusion eine komplette Hemmung eintrat, kam es in Abb. 13 B, ebenfalls nach etwa 13 min, zu einem Ausfall der regelmäßigen Kontraktionen (funktionelle Hemmung) für einen Zeitraum von etwa 15 min. Im Fall der Abb. 13 B kam es anschließend erneut zum Auftreten von Kontraktionen, diese waren jedoch unregelmäßig und zeigten eine deutlich erhöhte Druckschwelle. Der Pfeil kennzeichnet jeweils den Zeitpunkt der Zugabe von 3 mM NaHS.

3.2.1 Antagonisierung der H₂S-Wirkung

3.2.1.1 Blockade der Opioidrezeptoren mit Naloxon

Die Zugabe von 0,5 µM Naloxon bewirkte eine signifikante Stimulation der peristaltischen Aktivität. Es kam zu einem deutlichen Absinken des Schwellendruckes um $-16,1 \pm 8,8$ Pa, $-13,9 \pm 10,3$ Pa und $-7,2 \pm 3,6$ Pa in den verschiedenen Versuchsreihen sowie zu einem Anstieg der Frequenz der peristaltischen Kontraktionen.

Durch die Blockade der opioidergen Rezeptoren stieg die PPT nach Zugabe von 10 mM NaHS schwächer an als in den Kontrollgruppen ohne Naloxon ($143,5 \pm 43,3$ Pa gegenüber $225,6 \pm 26,0$ Pa). Bei Applikation von NaHS in den Konzentrationen 1 und 3 mM hatte eine Vorbehandlung mit Naloxon keinen signifikanten Einfluss auf den Anstieg der PPT ($11,0 \pm 6,0$ Pa gegen $9,2 \pm 4,9$ Pa der Kontrollgruppe mit Tyrodelösungvorbehandlung) (siehe Abb. 14 und 15).

3.2.1.2 Blockade der kalziumabhängigen Kaliumkanäle mit Apamin

Die extraserosale Applikation von 0,5 µM Apamin führte, ähnlich wie Naloxon, zu einem Absinken der PPT um ca. 10 Pa sowie zu einem Frequenzanstieg. Die Blockade der *low conductance* kalziumabhängigen Kaliumkanäle führte zu einem deutlich geringeren Anstieg des Schwellendruckes nach 3 bzw. 10 mM NaHS ($30,0 \pm 7,5$

Pa bzw. $58,2 \pm 20,3$ Pa) im Vergleich zur mit Tyrodelösung vorbehandelten Kontrollgruppe ($135,9 \pm 30,7$ Pa bzw. $225,6 \pm 26,0$ Pa). Der durch 1 mM NaHS ausgelöste Effekt auf die Peristaltik wurde durch Vorbehandlung mit Apamin nicht signifikant beeinflusst ($13,0 \pm 7,8$ Pa mit, bzw. $9,2 \pm 4,9$ Pa ohne Apamin) (vgl. Abb. 14 und 15).

3.2.1.3 Blockade der ATP-abhängigen Kaliumkanäle mit Glibenclamid

Glibenclamid zeigte keine Eigenwirkung auf die Peristaltik. Durch die Blockierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle durch Glibenclamid kam es durch die Perfusion mit 10 mM NaHS zu einem leicht schwächeren Anstieg der PPT gegenüber der mit Tyrodelösung vorbehandelten Kontrollgruppe ($107,4 \pm 30,0$ Pa gegenüber $225,6 \pm 26,0$ Pa). Auf die durch 1 und 3 mM NaHS hervorgerufene Schwellenänderung hatte die Glibenclamid-Vorbehandlung hingegen keine signifikanten Auswirkungen (siehe Abb. 14 und 15).

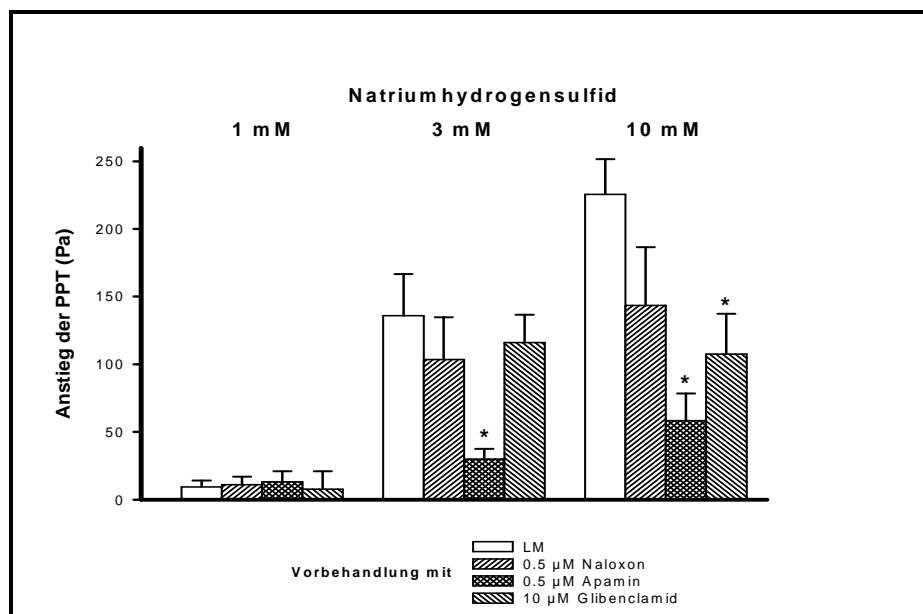


Abbildung 14: Einfluss einer Vorbehandlung mit Naloxon, Apamin oder Glibenclamid auf den Anstieg der PPT nach 1, 3 oder 10 mM NaHS im

Vergleich zur Kontrollgruppe (Tyrodelösung, LM). Die Säulen stehen für den mittleren PPT-Anstieg [Pa], die Fehlerbalken für den Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollmessung sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=7$. Bei Glibenclamid – 3 mM NaHS $n=11$, bei Naloxon und Glibenclamid – 10 mM NaHS $n=9$, bei Apamin – 10 mM NaHS $n=10$.

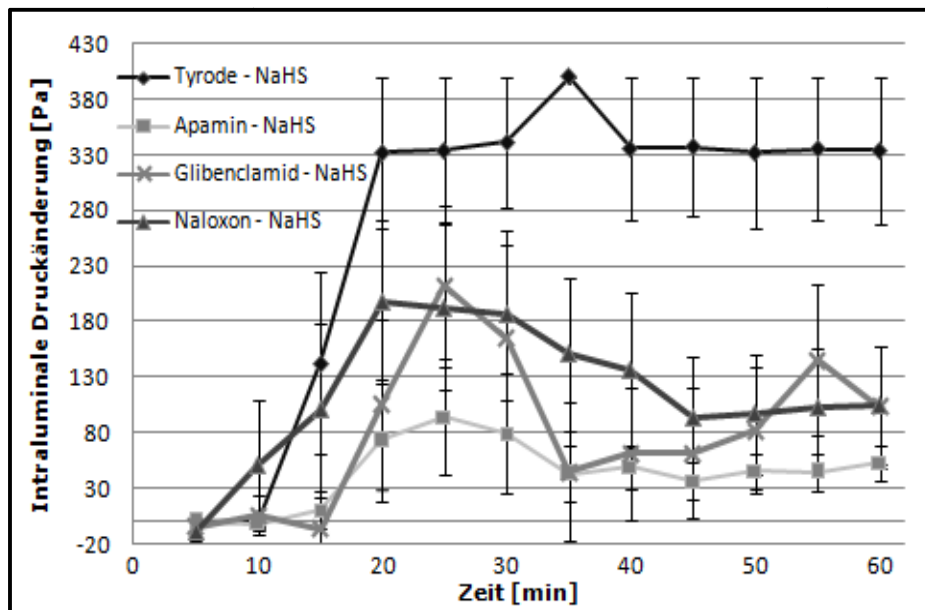


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und zeitlicher Verlauf des PPT-Anstieges durch Perfusion mit 10 mM NaHS nach einer Vorbehandlung mit Tyrodelösung, Naloxon, Apamin oder Glibenclamid. Die Aufzeichnung beginnt mit der Perfusion mit 10 mM NaHS, woraufhin eine Registrierung der intraluminalen Druckverhältnisse für jeweils 60 min erfolgte. Die Symbole stehen für den Mittelwert des PPT-Anstieges [Pa] zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

3.2.2 Interaktionen von H₂S und inhibitorisch wirksamen Pharmaka

3.2.2.1 Interaktion von NaHS und Midazolam

Die Applikation von 10, 30 und 100 μM des Benzodiazepins Midazolam bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der intestinalen Peristaltik. Die Folge war eine signifikante Erhöhung des

Schwellendruckes bis hin zur kompletten Aufhebung der Peristaltik ($158,7 \pm 23,3$ Pa, $303,6 \pm 9,8$ Pa und $318,7 \pm 12,3$ Pa) (siehe Abb. 16 und 17).

Bei den in dieser Versuchsreihe verwendeten Dünndarmsegmenten löste die Applikation von $30 \mu\text{M}$ Midazolam einen ungewöhnlich starken inhibitorischen Effekt auf die intestinale Peristaltik aus (vgl. Abb. 16). So führte die Applikation in allen getesteten Segmenten innerhalb der ersten 5 min zu einer kompletten Hemmung der Peristaltik. Eine Erholung der Peristaltik trat in keinem der Segmente ein.

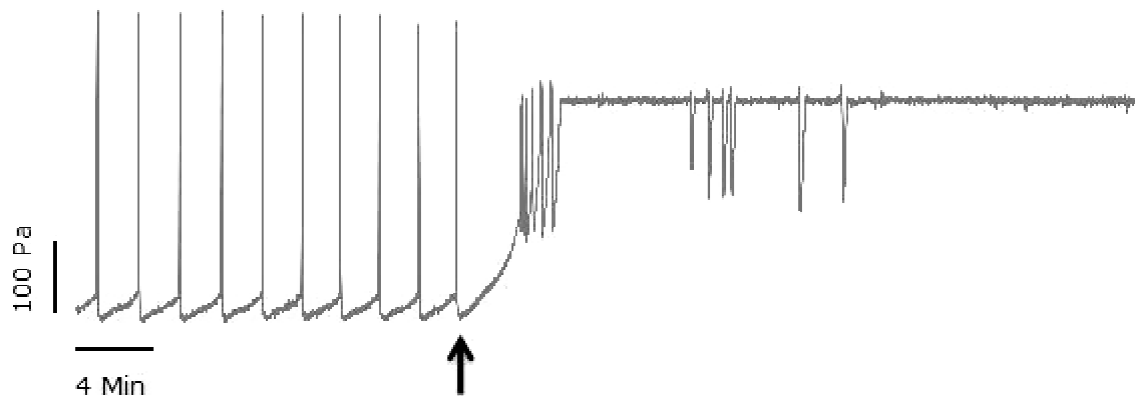


Abbildung 16: Originalregistrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] über einen Zeitraum von 60 min nach Applikation von $30 \mu\text{M}$ Midazolam nach einer dreißigminütigen Vorbehandlung mit Tyrodelösung. Nach dem Auftreten regelmäßiger Kontraktionen erfolgte die Zugabe von $30 \mu\text{l}$ Tyrodelösung in das Organbad. Nach 30 min wurden $30 \mu\text{M}$ Midazolam appliziert, worauf sofort ein Anstieg der PPT bis hin zur kompletten Hemmung der peristaltischen Aktivität registriert wurde. In den folgenden 60 min trat keine Erholung der Peristaltik ein. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe von $30 \mu\text{M}$ Midazolam.

Die Vorbehandlung der Segmente über 30 min mit $100 \mu\text{M}$ NaHS führte zu einer signifikanten Reduktion des durch $10 \mu\text{M}$ Midazolam ausgelösten PPT-Anstieges im Vergleich zur mit Tyrodelösung vorbehandelten Kontrollgruppe ($63,7 \pm 13,1$ Pa gegenüber $158,7 \pm$

23,3 Pa). Bei Midazolamkonzentrationen von 30 oder 100 μM konnte eine Vorbehandlung mit 100 μM NaHS keine Veränderung im Druckschwellenanstieg erzielen (siehe Abb. 17).

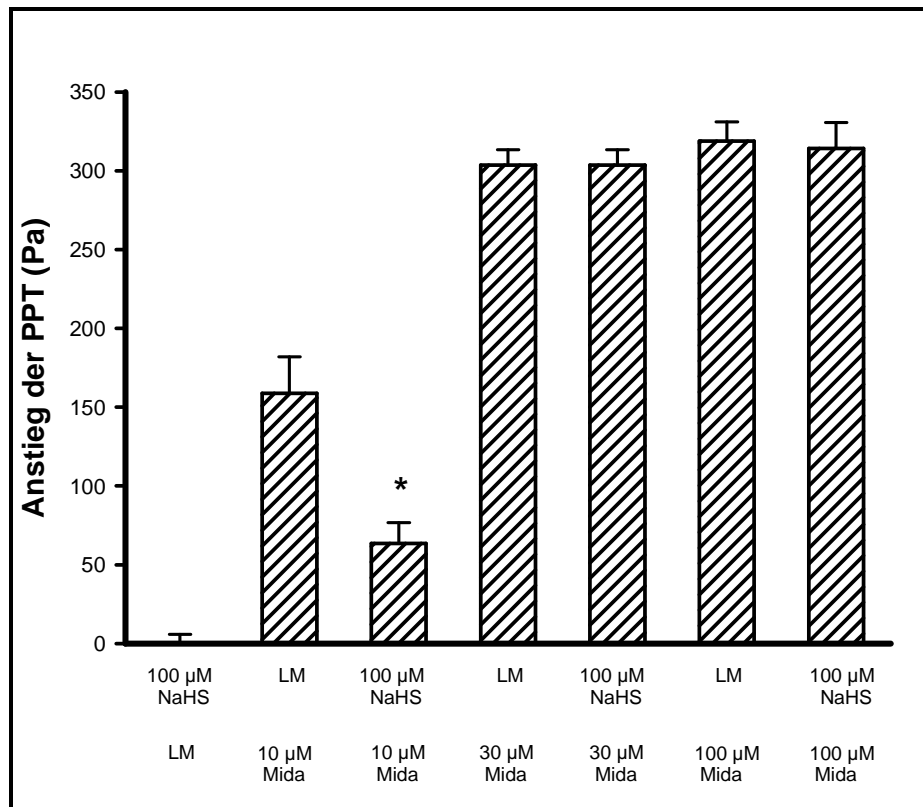


Abbildung 17: Einfluss einer Vorbehandlung mit 100 μM NaHS auf den Anstieg der PPT nach 10, 30 und 100 μM Midazolam (Mida) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tyrodelösungsvorbehandlung, LM). Die Säulen stehen für den mittleren PPT-Anstieg [Pa], die Fehlerbalken für den Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollmessung sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). Bei NaHS - Tyrodelösung und Tyrodelösung - 100 μM Midazolam $n=8$, Tyrodelösung - 10 μM Midazolam $n=6$, NaHS- 10 μM und 100 μM Midazolam $n=9$, Tyrodelösung - 30 μM Midazolam und Tyrodelösung - 100 μM Midazolam $n=7$.

3.2.2.2 Interaktion von NaHS und Fentanyl

Fentanyl, das als Agonist an opioidergen Rezeptoren wirkt, löste eine mit steigender Konzentration zunehmende Hemmung der peristaltischen Aktivität aus. So kam es durch die Applikation von 3

nM Fentanyl zu einem Anstieg der PPT um im Mittel $84,7 \pm 26,7$ Pa. Wurden 30 nM zugegeben, erfolgte ein PPT-Anstieg um $274,4 \pm 17,1$ Pa (vgl. Abb. 18). Die Vorbehandlung der Segmente mit 100 μ M NaHS, an Stelle von Tyrodelösung, führte nach Zugabe von 3 nM Fentanyl im Mittel zu einem etwa doppelt so starken Anstieg des Schwellendruckes ($190,1 \pm 34,1$ Pa statt $84,7 \pm 26,7$ Pa). Bei der Zugabe von 30 nM Fentanyl zu den mit NaHS vorbehandelten Segmenten wurde kein signifikanter Anstieg der PPT im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne NaHS beobachtet (siehe Abb. 18).

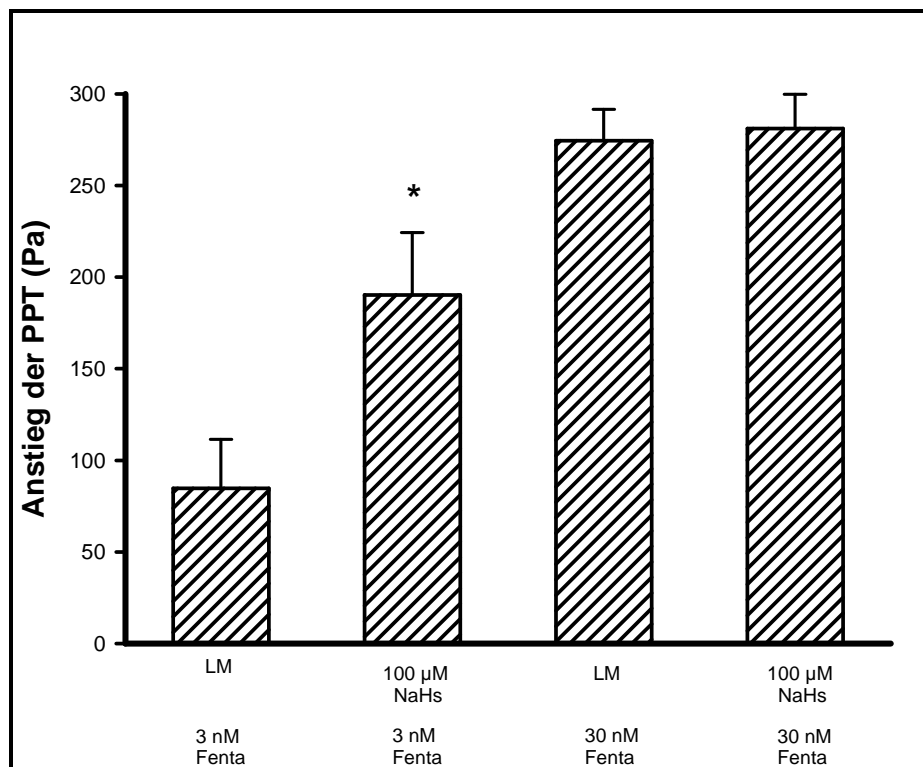


Abbildung 18: Einfluss der Vorbehandlung mit 100 μ M NaHS auf den Anstieg der PPT nach 3 und 30 nM Fentanyl (Fenta) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tyrodelösungsvorbehandlung, LM). Die Säulen stehen für den mittleren PPT-Anstieg [Pa], die Fehlerbalken für den Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollmessung sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). Bei Tyrodelösung – 3 nM Fentanyl und NaHS – 3 nM Fentanyl $n=7$, NaHS – 3 nM Fentanyl und Tyrodelösung – 30 nM Fentanyl $n=6$.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Wirkung von H₂S auf die Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens *in vitro* zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Natriumhydrogensulfid (NaHS) als H₂S-Donor als auch L-Cystein, eine Aminosäure im H₂S-Stoffwechsel, die peristaltische Aktivität des Dünndarmes konzentrationsabhängig hemmt.

Die Untersuchungen basierten auf einem, bereits in verschiedenen Studien etablierten, *in vitro*-Versuchsaufbau [Bülbring et al. 1958; Costall et al. 1993; Holzer & Maggi 1994].

Die Applikation der zu testenden Pharmaka erfolgte in mit isolierten Dünndarmsegmenten bestückte Organbäder. So konnte sichergestellt werden, dass die Segmente keine neuronale Verbindung zu übergeordneten regulatorischen Strukturen mehr aufwiesen. Folglich konnten die durch zugegebene Substanzen induzierten Effekte ausschließlich auf periphere enterische Mechanismen zurückgeführt werden.

Durch die spezielle Versuchsanordnung wurde durch eine kontinuierliche intraluminale Perfusion eine gleichmäßige Peristaltik induziert. Die peristaltische Kontraktion wurde hierbei jeweils bei einem konstanten intraluminalen Druck (PPT) ausgelöst. Dieser Schwellendruck hat sich bereits in zahlreichen Versuchsreihen als aussagekräftiger Parameter zur Quantifizierung des Einflusses getesteter Substanzen bewährt. So äußerte sich eine Zunahme der Sensitivität der intestinalen neuronalen Strukturen in einem Absinken der PPT, ein inhibitorischer Effekt in einem Anstieg der Schwelle, bis hin zur völligen Hemmung der peristaltischen Aktivität [Costall et al. 1993; Holzer & Maggi 1994; Waterman & Costa 1994; Bartho & Holzer 1995; Holzer 1997; Holzer et al. 1997; Holzer et al. 1998].

Da die hier gewonnenen Daten aus einer *in vitro*-Versuchsanordnung stammen, lassen sie sich nicht ohne Weiteres auf die Situation *in vivo* übertragen. Hierfür bedarf es der Berücksichtigung verschiedener Einflussfaktoren. Zum einen speziesspezifische Unterschiede zwischen Meerschweinchen und Mensch, zum anderen zwischen den unterschiedlichen Bedingungen bei *in vitro*- und *in vivo*-Versuchsanordnungen. So werden in einer *in vitro*-Untersuchung wichtige Parameter, die am lebenden Objekt die Wirkung der verabreichten pharmakologischen Substanzen maßgeblich beeinflussen, nicht berücksichtigt. Beispiele für solche Einflussgrößen sind die Pharmakokinetik sowie die modulierende Funktion übergeordneter, zentralnervöser Neurone auf den Darm.

Andererseits ist eine systematische Untersuchung der Wirkung verschiedener Pharmaka auf die menschliche Darmmotilität aus methodischen Gründen nur schwer realisierbar. Daher ist der Dünndarm des Meerschweinchens, der aus physiologischer und pharmakologischer Sicht zahlreiche Gemeinsamkeiten mit dem Dünndarm des Menschen aufweist, ein geeignetes Organmodell.

4.1 L-Cystein

In den vorliegenden Versuchen führte die Applikation von L-Cystein zu einer konzentrationsabhängigen inhibitorischen Wirkung auf die Peristaltik. Dabei war der hemmende Effekt in den ersten 20 min nach der Applikation stärker als im folgenden Zeitintervall von 60 min. Diese Hemmung war stets reversibel und führte nach durchschnittlich 28 min zu einer Erholung der Peristaltik und zu einem erneuten Auftreten von regelmäßigen Kontraktionen.

Aus diesen Ergebnissen resultiert die Annahme, dass es durch die Applikation von L-Cystein, einem natürlichen Substrat der endogenen H₂S-Biosynthese, zu einem Anstieg des Gehaltes an endogenem H₂S kommt. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Distrutti et al., die

zeigten, dass eine L-Cystein-Applikation ebenso wie die Zugabe von H_2S , zu einer Relaxation der kolorektalen Muskulatur führt [Distrutti et al. 2006a].

Beim Cystein handelt es sich um ein Racemat von L- und D-Enantiomeren. Die L-Form ist für die physiologische Funktion ausschlaggebend und dient den Enzymen CBS und CSE als Substrat. In den vorliegenden Versuchen induzierte die Applikation des inaktiven D-Cysteins allerdings ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die intestinale Peristaltik. Jedoch war der Anstieg der PPT hierbei deutlich schwächer ausgeprägt als nach Zugabe von L-Cystein. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es zu einer Umwandlung vom inaktiven Enantiomer in die aktive L-Form gekommen ist.

Die im Anschluss durchgeführten Versuche basierten auf der Annahme, dass die Enzyme CSE und CBS im Ileum und Jejunum die Umwandlung von L-Cystein zu H_2S vermitteln.

Durch die Hemmung des Enzymes CSE durch die Applikation von Cyanoalanin, einem potenten, reversiblen Antagonisten dieses Enzymes [Pfeffer & Ressler 1967; Uren et al. 1978], kam es zu keinem signifikanten Effekt auf den PPT-Anstieg. Folglich liefern unsere Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass CSE maßgeblich in die endogene H_2S -Produktion involviert ist. Dementsprechend lassen sich die Ergebnisse nicht mit denen von Teague, Asiedu und Moore von 2002 in Einklang bringen. In deren Versuchen resultierte die Zugabe von 1 mM β -Cyanoalanin in einer gesteigerten, durch elektrische Stimulation ausgelösten Kontraktilität, welche sich durch die Applikation von 1 mM Cystein wieder reduzieren ließ [Teague et al. 2002]. Auch decken sich unsere Ergebnisse nicht mit denen verschiedener Untersuchungen, die ein Vorkommen sowohl des Enzymes CBS als auch CSE im Ileum von Meerschweinchen nachweisen konnten [Hosoki et al. 1997; Wang 2002].

Hydroxylamin, ein Inhibitor der CBS-vermittelten Biosynthese von H_2S , induzierte *per se* eine erhöhte Druckschwelle, wobei die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen bisher nicht weiter erforscht wurden. Die Vorbehandlung der Segmente mit Hydroxylamin zeigte keine signifikanten Effekte auf das Ansteigen der PPT nach L-Cystein. Dennoch war eine Tendenz erkennbar, dass sich dieser Anstieg der Druckschwelle durch Hydroxylaminvorbehandlung reduzieren lässt. Da die zu geringe Druckdifferenz nicht aussagekräftig genug ist und eine große Streuung aufweist, kann nicht sicher auf eine Beteiligung des Enzymes CBS an der H_2S -Entstehung im Dünndarm des Meerschweinchens geschlossen werden. Für ein eindeutiges Ergebnis wären weitere Untersuchungen an mehr Darmsegmenten nötig.

Auch eine Steigerung des H_2S -Gehaltes durch eine Verstärkung der Enzymaktivität mittels S-Adenosyl-L-Methionin war in unseren Versuchen nicht möglich. S-Adenosyl-L-Methionin ist als allosterischer Aktivator in der Lage, die Aktivität des Enzymes CBS bis auf das Dreifache zu steigern [Finkelstein et al. 1975; Eto & Kimura 2002; Lowicka & Beltowski 2007]. Im Gehirn, wo CBS als verantwortliches Enzym für die endogene Produktion von H_2S identifiziert wurde, bewirkt die Zugabe dieses Aktivators einen messbaren Anstieg der H_2S -Bildung [Abe & Kimura 1996]. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass das Enzym CBS maßgeblich an der H_2S -Produktion im Ileum beteiligt ist.

Bei den Versuchen mit Cystein trat eine starke Streuung der PPT-Werte auf, deren Ursache momentan im Unklaren bleibt.

4.2 H_2S

Verschiedene Untersuchungen, unter anderem von Teague, Asiedu und Moore aus dem Jahr 2002, konnten bereits einen inhibitorischen Effekt von exogenem H_2S auf die Peristaltik des Meerschweinchenileums *in vitro* aufzeigen. In den oben genannten

Studien handelte es sich um eine schnell einsetzende Hemmung der durch elektrische Stimulation oder exogenes Acetylcholin ausgelösten, peristaltischen Kontraktionen. Diese durch den H₂S-Donor Natriumhydrogensulfid induzierte Entspannung der glatten Muskulatur war dosisabhängig, zum Großteil in Konzentrationen, die den physiologisch im menschlichen Blut vorkommenden ähnelten (10 - 100 µM) [Richardson et al. 2000; Teague et al. 2002].

Im menschlichen Blutplasma kann der Gehalt an H₂S je nach Autor zwischen 10 - 160 µM betragen. In den meisten Geweben finden sich Konzentrationen von ca. 50 µM [Abe & Kimura 1996; Hosoki et al. 1997; Zhao et al. 2001; Lowicka & Beltowski 2007].

Welche Konzentrationen von H₂S in den vorliegenden Untersuchungen im Dünndarm bzw. an den Neuronen des enterischen Nervensystems durch Perfusion mit dem H₂S-Donor Natriumhydrogensulfid erreicht wurden, ist unbekannt. Für diese Experimente stand keine quantitative Nachweismethode für H₂S zur Verfügung, so dass im Hinblick auf die Frage nach der lokalen Konzentration von H₂S im Gewebe keine Aussagen oder Vermutungen möglich sind.

Um den Wirkmechanismus der H₂S-vermittelten Hemmung näher zu charakterisieren, wurden Darmsegmente mit Antagonisten und Agonisten der verschiedenen vermuteten Transduktionsmechanismen vorbehandelt.

4.2.1 Wirkung über endogene opioiderge Mechanismen

Durch eine Vorbehandlung mit Naloxon lässt sich die Frage klären, ob NaHS bzw. H₂S seine inhibitorische Wirkung über endogene opioiderge Mechanismen ausübt. Opiode hemmen *per se* die Peristaltik des Dünndarmes, was sich durch Zugabe des kompetitiven Opioidrezeptorantagonisten Naloxon aufheben lässt [Ruckenbusch et al. 1984].

Nach Applikation von Naloxon kommt es zu einem Frequenzanstieg der peristaltischen Kontraktionen sowie zu einer erniedrigten Druckschwelle (PPT). Naloxon führt demzufolge zu einer Stimulation der Darmmotilität [Kromer 1990; De Luca & Coupar 1996; Holzer et al. 1998]. Erklärt werden kann dieses Phänomen durch die Tatsache, dass Endorphine unter physiologischen Bedingungen eine hemmende Wirkung auf die intestinale Motilität haben, so dass es folglich bei Blockade der Opioidrezeptoren zu einer properistaltischen Wirkung kommt. Diese Ergebnisse konnten auch in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden.

Bei Zugabe von 10 mM NaHS nach Naloxonvorbehandlung zeigte sich, dass Naloxon die inhibitorische Wirkung des NaHS bzw. H₂S reduziert, jedoch nicht vollständig aufhebt. Diese Antagonisierbarkeit der NaHS-Wirkung mit Naloxon weist auf eine mögliche Aktivierung opioidsensitiver enterischer Neurone durch NaHS hin, über die der inhibitorische Effekt auf die Dünndarmperistaltik vermittelt wird [Herbert et al. 2002a,b; Shahbazian et al. 2002]. Auf eine Bindung von NaHS an Opioidrezeptoren kann hierbei nicht geschlossen werden.

Diese Ergebnisse stimmen jedoch nicht mit denen von Teague, Asiedu und Moore überein, nach denen eine Naloxonvorbehandlung keine Auswirkung auf den Effekt des H₂S auf die elektrisch stimulierte Darmmotilität zeigte [Teague et al. 2002].

4.2.2 Wirkung über kalziumabhängige Kaliumkanäle

Es ist bekannt, dass *low conductance* kalziumabhängige Kaliumkanäle die Regulation propulsiver Peristaltik beeinflussen und an der Hemmwirkung von Pharmaka wie Midazolam, Clonidin und Dexmedetomidin auf die Darmmotilität beteiligt sind [Costa et al. 1986; Herbert et al. 1999; Herbert et al. 2002b; Wenderoth 2002].

Um auf eine mögliche Beteiligung dieser Kanäle an der inhibitorischen Wirkung des H₂S schließen zu können, erfolgte eine Vorbehandlung der entsprechenden Segmente mit Apamin. Hierbei handelt es sich um einen selektiven Hemmstoff dieser langsam leitenden kalziumabhängigen Kaliumkanäle [Costa et al. 1986]. Die Vorbehandlung führte zu einem signifikant schwächeren PPT-Anstieg nach Applikation von NaHS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Blockierung der kalziumabhängigen Kaliumkanäle resultierte ein deutlich schwächerer Anstieg des Schwellendruckes als nach Antagonisierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle oder der Opioidrezeptoren, was auf eine bedeutsame Rolle dieser Kanäle in der H₂S-vermittelten Hemmung der Peristaltik schließen lässt.

Apamin selbst, wie auch Naloxon, hatte in den vorliegenden Versuchen einen stimulierenden Effekt auf die intestinale Motilität. Die Applikation bewirkte einen Frequenzanstieg der Kontraktionen und eine erniedrigte Druckschwelle. Diese Tatsache wurde auch bereits in zahlreichen anderen Untersuchungen bestätigt [Heinemann & Holzer 1999].

4.2.3 Wirkung über ATP-abhängige Kaliumkanäle

Zu den bisher am besten erforschten Aktivitäten des H₂S zählt die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen, wobei die genauen Mechanismen, mit welchen H₂S diese Kanäle aktiviert, noch nicht bekannt sind. Eine solche Eigenschaft wurde bereits für einige Gewebe nachgewiesen. Hierzu zählen Blutgefäße [Zhao et al. 2001; Cheng et al. 2004; Tang et al. 2005], das Myokardium [Geng et al. 2004], der Karotissinus [Xiao et al. 2006], Neurone [Distrutti et al. 2006a,b], β -Zellen des Pankreas [Yang et al. 2005] und auch die glatten Muskelzellen des Kolons [Distrutti et al. 2006a]. Über diesen Wirkmechanismus hyperpolarisiert H₂S Zellmembranen, reduziert die Erregbarkeit von Neuronen und entspannt glatte Muskelzellen. So

kommt es beispielsweise zu einer gefäßrelaxierenden und blutdrucksenkenden Wirkung [Zhao et al. 2001; Tang et al. 2005] und zur Vermittlung antinozizeptiver Effekte [Distrutti et al. 2006a, b; Zanardo et al. 2006].

In Versuchen von Teague, Asiedu und Moore hatte der selektive K_{ATP} -Kanal-Blocker Glibenclamid keinen Einfluss auf die durch elektrische Stimulation ausgelösten Kontraktionen. Daraus wurde gefolgert, dass hier keine Beteiligung von K_{ATP} -Kanälen vorliegt [Teague et al. 2002]. Hingegen reduzierte in unseren Untersuchungen eine Vorbehandlung mit 10 μ M Glibenclamid den motilitätshemmenden Effekt des NaHS, was wiederum eine Beteiligung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen auf die Peristaltik nahelegt.

4.2.4 Interaktion mit Midazolam

Weiterführende Experimente gingen der Frage nach, ob H_2S die motilitätshemmende Wirkung des Benzodiazepins Midazolam oder des Opioidagonisten Fentanyl beeinflusst.

Die Applikation von Midazolam führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der PPT bis hin zur vollständigen Aufhebung peristaltischer Aktivitäten. Auffällig war bei den hier verwendeten Tieren, dass bereits bei Konzentrationen von 30 μ M eine ungewöhnlich starke Hemmung der Peristaltik auftrat, wie sie in anderen Versuchen erst ab einer Konzentration von 100 μ M zu beobachten war [Wenderoth 2002].

In der Versuchsreihe mit 10 μ M Midazolam ließ sich die Erhöhung des Schwellendruckes durch eine Vorbehandlung der Segmente mit 100 μ M NaHS signifikant reduzieren, was ein Hinweis auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen H_2S und dem Benzodiazepin sein könnte.

Bei Zugabe von Midazolam in den Konzentrationen 30 und 100 μ M konnte eine Vorbehandlung mit NaHS den Anstieg der PPT nicht abschwächen, was vermutlich an der stark überschwelligen

Konzentration von Midazolam und der maximal möglichen Hemmwirkung liegt.

Diese abschwächende Wirkung von NaHS auf die Hemmwirkung durch das wasserlösliche Midazolam könnte ein Hinweis auf eine protektive Rolle von H₂S im enterischen Nervensystem sein.

4.2.5 Interaktion mit Fentanyl

Opioide sind Dank ihrer hohen analgetischen Potenz zur Behandlung von Intensivpatienten ebenso unverzichtbar wie Benzodiazepine. Fentanyl mit einer etwa 100-fach höheren analgetischen Wirksamkeit als Morphin ist das derzeit in der Intensivmedizin am häufigsten eingesetzte Opioid. Eine typische Nebenwirkung von Opioiden ist die Hemmung der Darmmotilität, die darauf beruht, dass Opioide die Freisetzung von Acetylcholin aus den präsynaptischen Endigungen cholinerg Neurone inhibieren und die exzitatorische Signalübertragung zwischen den enterischen Neuronen und den glatten Muskelzellen unterbrechen [De Luca & Coupar 1996]. Die Vorbehandlung der Darmsegmente mit NaHS verstärkte die hemmende Wirkung von Fentanyl auf die Peristaltik. Dies war jedoch nur bei Fentanyl in 3 nM Konzentration nachzuweisen, da 30 nM Fentanyl *per se* bereits eine nahezu vollständige Peristaltikhemmung hervorrief. Die Mechanismen, über die H₂S die Wirkung von Fentanyl verstärkt, bleiben derzeit ungeklärt und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Möglicherweise spielt es eine Rolle, dass Fentanyl eine lipophile Substanz ist, Midazolam hingegen wasserlöslich. Beide Substanzen, Fentanyl und Midazolam, wirken über ganz unterschiedliche Mechanismen inhibitorisch am Dünndarm. Während Fentanyl über μ -Opioidrezeptoren die Dünndarmmotilität beeinflusst, hemmt Midazolam die Peristaltik über Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle [Wenderoth 2002]. Insgesamt sind es interessante erste Hinweise,

dass H_2S die hemmende Wirkung von Substanzen auf die Dünndarmmotilität sowohl vermindern, als auch verstärken kann.

5 Zusammenfassung

Eine Störung der intestinalen Peristaltik kann vielfältige und komplexe Auswirkungen auf die Gesundheit des Patienten haben. Besonders hervorzuheben sind hierbei Sepsis oder Multiorganversagen, welche vor allem bei Patienten mit kritischem Gesundheitszustand oder multiplen Verletzungen auftreten können. Folglich kommt der Aufrechterhaltung einer regelmäßigen intestinalen Peristaltik, besonders bei kritisch kranken Intensivpatienten, eine große Bedeutung zu.

Schwefelwasserstoff (H_2S) ist ein endogener Mediator des enterischen Nervensystems, wobei die physiologische Bedeutung von H_2S auf die Magen-Darm-Motilität noch nahezu unbekannt ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung dieses Gases auf die intestinale Motilität und den zugrunde liegenden Mechanismen. Für die Versuche wurde eine bewährte *in vitro*-Versuchsvorrichtung gewählt, die es erlaubt, isolierte Darmsegmente des Meerschweinchens mit einer Flüssigkeit zu perfundieren. Durch eine kontinuierliche intraluminale Füllung und einen distalen Widerstand war es möglich, peristaltische Kontraktionen von oral nach aboral zu generieren. Der zur Auslösung einer solchen Kontraktion nötige Druck (*peristaltic pressure threshold*, PPT) wurde als Auswertungsparameter herangezogen und erlaubte das Erkennen einer inhibitorischen oder stimulierenden Wirkung der zugegebenen Substanz. Die Applikation der Testsubstanzen erfolgte extraserosal beziehungsweise intraluminal *via perfusionem*.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass NaHS als H_2S -Donor wie auch die Synthesevorstufe L-Cystein die intestinale Peristaltik konzentrationsabhängig hemmen.

Eine Beteiligung der Enzyme CSE und CBS an der endogenen H₂S-Produktion im Ileum des Meerschweinchens konnte in den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden. Die selektive Inhibition des jeweiligen Enzymes durch die Enzyminhibitoren Cyanoalanin beziehungsweise Hydroxylamin bewirkte keinen signifikant geringeren Anstieg der PPT nach Applikation von L-Cystein. Die Applikation des Aktivators der Hydrogensulfid-Synthetase S-Adenosyl-L-Methionin zeigte ebenfalls keinen statistisch relevanten Effekt auf die hemmende Wirkung von L-Cystein.

Die Blockade von opioidergen Rezeptoren an enterischen Neuronen durch Naloxon konnte die inhibitorische Wirkung von NaHS vermindern. Ebenso reduzierten Apamin und Glibenclamid die Hemmwirkung von NaHS, was auf eine Beteiligung von sowohl kalziumabhängigen als auch von ATP-abhängigen Kaliumkanälen schließen lässt.

In ersten weiterführenden Experimenten interessierte die Wechselwirkung zwischen NaHS bzw. H₂S und in der Intensivmedizin angewandten Pharmaka zur Sedierung und Analgesie, wie Midazolam und Fentanyl, die beide einen hemmenden Effekt auf die Dünndarmperistaltik haben. NaHS reduzierte die motilitätshemmende Wirkung von Midazolam, verstärkte jedoch die des exogen zugeführten Opioids Fentanyl. Dies legt nahe, dass endogenes H₂S die Wirkung exogen zugeführter Pharmaka in unterschiedlicher Weise zu modulieren vermag, wobei gegenwärtig unklar bleibt, wovon dieser modulierende Effekt abhängt.

6 Quellenverweis

6.1 Literaturverzeichnis

Abe K. & Kimura H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16:1066–1071

Barañano D.E., Ferris C.D. & Snyder S.H. (2001) Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 24:99-106

Barthó L. & Holzer P. (1995) The inhibitory modulation of guinea-pig intestinal peristalsis caused by capsaicin involves calcitonin gene-related peptide and nitric oxide. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353:102-109

Belardinelli M.C., Chabli A., Chadeaux-Vekemans B. & Kamoun P. (2001) Urinary sulfur compounds in Down syndrome. *Clin Chem* 47:1500-1501

Bhatia M., Sidhapuriwala J., Moochhala S.M. & Moore P.K. (2005) Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 145:141-144

Bhatia M., Wong F.L., Fu D., Lau H.Y., Moochhala S.M. & Moore P.K. (2005) Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *The FASEB Journal* 19:623-625

Bülbring E., Crema A. & Saxby O.B. (1958) A method for recording peristalsis in isolated intestine. *Br J Pharmacol* 13:440-443

Chadefaux B., Rethoré M.O., Raoul O., Ceballos I., Poissonnier M., Gilgenkranz S. & Allard D. (1985) Cystathionine beta synthase: gene dosage effect in trisomy 21. *Biochem Biophys Res Commun* 128:40-44

Chadefaux B., Ceballos I., Hamet M., Coude M., Poissonnier M., Kamoun P. & Allard D. (1988) Is absence of atheroma in Down syndrome due to decreased homocysteine levels? *The Lancet* 2:741

Cheng Y., Ndisang J.F., Tang G., Cao K. & Wang R. (2004) Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:2316-2323

Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B. & Graham I. (1991) Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324:1149-1155

Coruzzi G., Venturi N. & Spaggiari S. (2007) Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Biomed* 78:96-110

Costa M., Furness J.B. & Humphreys C.M.S. (1986) Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332:79-88

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

De Luca A. & Coupar I.M. (1996) Insights into opioid action in the intestinal tract. *Pharmacol Ther* 69:103-115

Distrutti E., Sediari L., Mencarelli A., Renga B., Orlandi S., Antonelli E., Roviezzo F., Morelli A., Cirino G., Wallace J.L. & Fiorucci S. (2006a) Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating K_{ATP} channels. *J Pharmacol Exp Ther* 316:325–335

Distrutti E., Sediari L., Mencarelli A., Renga B., Orlandi S., Russo G., Caliendo G., Santagada V., Cirino G., Wallace J.L. & Fiorucci S. (2006b) 5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-Thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 319:447-458

Doeller J.E., Isbell T.S., Benavides G., Koenitzer J., Patel H., Patel R.P., Lancaster Jr. J.R., Darley-Usmar V.M. & Kraus D.W. (2005) Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical Biochemistry* 341:40-51

Elrod J.W., Calvert J.W., Morrison J., Doeller J.E., Kraus D.W., Tao L., Jiao X., Scalia R., Kiss L., Szabo C., Kimura H., Chow C-W. & Lefer D.J. (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *PNAS* 104:15560-15565

Eto K. & Kimura H. (2002) The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain. *J Neurochem* 83:80-86

Finkelstein J.D., Kyle W.E., Martin J.L. & Pick A.M. (1975) Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 66:81-87

Fiorucci S., Distrutti E., Cirino G. & Wallace J.L. (2006) The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131:259-271

Fiorucci S., Orlandi S., Mencarelli A., Caliendo G., Santagada V., Distrutti E., Santucci L., Cirino G. & Wallace J.L. (2007) Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol* 150:996-1002

Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J. & Tanga C. (2004) H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun* 313:362-368

Guidotti T.L. (1996) Hydrogen sulphide. *Occup Med* 46:367-371

Heinemann A. & Holzer P. (1999) Intestinal motor depression by 7-nitroindazole through an action unrelated to nitric oxide synthase inhibition. *Pharmacology* 59:310-320

Herbert M.K. (1998) Impairment of intestinal motility in the critically ill patient. Clinical implications and contribution of drugs and mediators. In *Problems of the gastrointestinal tract in anaesthesia*,

the perioperative period, and intensive care. ed. Herbert M.K., Holzer P. & Roewer N. pp. 28-38. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag

Herbert M.K. (2001) Die Magen-Darm-Atonie beim Intensivpatienten. Mechanismen, Ursachen, Therapie. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 36:337-359

Herbert M.K., Berg W., Kublik A., Holzer P. & Roewer N. (2002a) Thio- und Oxybarbiturate hemmen die Dünndarmperistaltik. *In vitro*-Untersuchungen am Meerschweinchenileum. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37:721-726

Herbert M.K., Roth-Goldbrunner S., Holzer P. & Roewer N. (2002b) Clonidine and dexmedetomidine potently inhibit peristalsis in the guinea pig ileum *in vitro*. *Anesthesiology* 97:1491-1499

Herbert M.K., Weis R., Holzer P. & Roewer N. (2005) Peristalsis in the guinea pig small intestine *in vitro* is impaired by acetaminophen but not aspirin and dipyrrone. *Anesth Analg* 100:120-7

Herrmann W. (2002) Die Bedeutung der Hyperhomocysteinämie als Risikofaktor für degenerative Erkrankungen: ein Überblick. *J Ernährungsmed* 4:7-14

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

Holzer P. (1997) Involvement of nitric oxide in the substance P-induced inhibition of intestinal peristalsis. *NeuroReport* 8:2857-2860

Holzer P., Lippe I.Th., Tabrizi A.F., Lénárd L., Barthó Jr. & Barthó L. (1997) Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine. *J Pharmacol Ther* 280:154-161

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

Hosoki R., Matsuki N. & Kimura H. (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237:527-531

Hu L.-F., Wong P.T.-H., Moore P.K. & Bian J.-S. (2007) Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *J Neurochem* 100:1121-1128

Johansen D., Ytrehus K. & Baxter G.F. (2006) Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury; Evidence for a role of K_{ATP} channels. *Basic Res Cardiol* 101:53-60

Kamoun P. (2004) Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 26:24-254

Kawabata A., Ishiki T., Nagasawa A., Yoshida S., Maeda Y., Takahashi T., Sekiguchi F., Wada T., Ichida S. & Nishikawa H. (2007) Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain* 132:74-81

Khan A.A., Schuler M.M., Prior M.G., Yong S., Coppock R.W., Florence L.Z. & Lillie L.E. (1990) Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 103:482-490

Kimura H. (2000) Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 267:129-133

Kimura Y., Dargusch R., Schubert D. & Kimura H. (2006) Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 8:661-670

Kredich N.M., Foote L.J. & Keenan B.S. (1973) The stoichiometry and kinetics of the inducible cysteine desulfhydrase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 248:6187-6197

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

Landow L. & Andersen L.W. (1994) Splanchnic ischemia and its role in multiple organ failure. *Acta Anaesthesiol Scand* 38:626-639

Levonen A.L., Lapatto R., Saksela M. & Raivio K.O. (2000) Human cystathionine γ -lyase: developmental and in vitro expression of two isoforms. *Biochem J* 347:291-295

Li L., Bhatia M. & Moore P.K. (2006) Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation? *Current Opin Pharmacol* 6:125-129

Li L., Bhatia M., Zhu Y.Z., Zhu Y.C., Ramnath R.D., Wang Z.J., Anuar F.B.M., Whiteman M., Salto-Tellez M. & Moore P.K. (2005) Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *The FASEB Journal* 19:1196-1198

Li L., Rossoni G., Sparatore A., Lee L.C., Del Soldato P. & Moore P.K. (2007) Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radical Biology & Medicine* 42:706-719

Lowicka E. & Beltowski J. (2007) Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Reports* 59:4-24

Lu Y., O'Dowd B.F., Orrego H. & Isreal Y. (1992) Cloning and nucleotide sequence of human liver cDNA encoding for cystathionine γ -lyase. *Biochem Biophys Res Commun* 189:749-758

Mancardi D., Penna C., Merlino A., Del Soldato P., Wink D.A. & Pagliaro P. (2009) Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. *Biochim Biophys Acta* 1787:864-872

Meier M., Janosik M., Kery V., Kraus J.P. & Burkhard P. (2001) Structure of human cystathionine β -synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *EMBO J* 20:3910-3916

Milby T.H. & Baselt R.C. (1999) Hydrogen sulfide poisoning: clarification of some controversial issues. *Am J Indust Med* 35:192-195

Moore F.A. & Moore E.E. (1995) Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 75:257-277

Moore P.K., Bhatia M. & Moochhala S. (2003) Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 24:609-611

Mok Y.-Y.P., Atan M.S.B.M., Ping C.Y., Jing W.Z., Bhatia M., Moochhala S. & Moore P.K. (2004) Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br J Pharmacol* 143:881-889

Mok Y.-Y.P. & Moore P.K. (2008) Hydrogen sulphide is pro-inflammatory in haemorrhagic shock. *Inflamm Res* 57:512-518

Nishi N., Tanabe H., Oya H., Urushihara M., Miyanaka H. & Wada F. (1994) Identification of probasin-related antigen as cystathionine γ -lyase by molecular cloning. *J Biol Chem* 269:1015-1019

Pfeffer M. & Ressler C. (1967) β -cyanoalanine, an inhibitor of rat liver cystathionase. *Biochem Pharmacol* 16:2290-2308

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A-S., McNamara J.O. & White L.E. (2008) Neuroscience. In *neurotransmitters and their receptors*. pp. 133-134. Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc.

Qu K., Lee S.W., Bian J.S., Low C.-M. & Wong P.T.-H. (2008) Hydrogen sulfide: Neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int* 52:155-165

Richardson C.J., Magee E.A.M. & Cummings J.H. (2000) A new method for the determination of sulphide in gastrointestinal contents

and whole blood by microdistillation and ion chromatography. *Clinica Chimica Acta* 293:115-125

Ruckebusch Y., Ferré J.P. & Du C. (1984) In vivo modulation of intestinal motility and sites of opioid effects in the rat. *Regul Peptides* 9:109-117

Shahbazian A., Heinemann A., Schmidhammer H., Beubler E., Holzer-Petsche U. & Holzer P. (2002) Involvement of μ - and κ -, but not δ -, opioid receptors in the peristaltic motor depression caused by endogenous and exogenous opioids in the guinea-pig intestine. *Br J Pharmacol* 135:741-750

Sivarajah A., McDonald M.C. & Thiemermann C. (2006) The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock* 26:154-161

Stipanuk M.H. & Beck P.W. (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206:267-277

Smith H.S. (2009) Hydrogen sulfide's involvement in modulating nociception. *Pain Physician* 12:901-910

Sun Y.D. & Benishin C.G. (1994) K^+ channel openers relax longitudinal muscle of guinea pig ileum. *Eur J Pharmacol* 271:453-459

Tang G., Wu L., Liang W. & Wang R. (2005) Direct stimulation of K_{ATP} channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 68:1757-1764

Teague B., Asiedu S. & Moore P.K. (2002) The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 137:139-145

Telezhkin V., Brazier S.P., Cayzac S., C.T. Müller C.T., Riccardi D. & Kemp P.J. (2009) Hydrogen sulfide inhibits human BK(Ca) channels. *Adv Exp Med Biol* 648:65-7

Trendelenburg P. (1917) Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. *Arch exp Pathol Pharmacol* 81:55-129

Uren J.R., Ragin R. & Chaykovsky M. (1978) Modulation of cysteine metabolism in mice – effects of propargylglycine and L-cyst(e)ine-degrading enzymes. *Biochem Pharmacol* 27:2807-2814

Usui M., Matsuoka H., Miyazaki H., Ueda S., Okuda S. & Imaizumi T. (1999) Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inaemia: restoration by folic acid. *Clin Sci* 96:235-239

Wallace J.L. (2007) Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci* 28:501-505

Wallace J.L., Caliendo G., Santagada V., Cirino G. & Fiorucci S. (2007a) Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a

hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology* 132:261-271

Wallace J.L., Dickey M., McKnight W. & Martin G.R. (2007b) Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB J* 21:4070-4076

Wang R. (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16:1792-1798

Waterman S.A. & Costa M. (1994) The role of enteric inhibitory motoneurons in peristalsis in the isolated guinea-pig small intestine. *J Physiol* 477:459-468

Wenderoth H. (2002) Wirkung des Benzodiazepins Midazolam auf die Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens in vitro. *Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät der Universität Würzburg*

Xiao L., Wu Y-M., Zhang H., Liu Y-X. & He R-R. (2006) Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus baroreflex in anesthetized rats. *Acta Pharmacol Sinica* 27:294-298

Yamaguchi S., Kanmura Y. & Yoshimura N. (1997) Effects of midazolam on contractions in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *Anesth and Analg* 84:199-205

Yamakage M., Matsuzaki T., Tsujiguchi N., Honma Y. & Namiki A. (1999) Inhibitory effects of diazepam and midazolam on Ca²⁺ and K⁺ channels in canine tracheal smooth muscle cells. *Anesthesiology* 90:197-207

Yang W., Yang G., Jia X., Wu L. & Wang R. (2005) Activation of K_{ATP} channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol* 569.2:51-531

Yoshimura H., Kai T., Nishimura J., Kobayashi S., Takahashi S. & Kanaide H. (1995) Effects of midazolam on intracellular Ca²⁺ and tension in airway smooth muscles. *Anesthesiology* 83:1009-1020

Zanardo R.C.O., Brancalone V., Distrutti E., Fiorucci S., Cirino G., Wallace J.L. (2006) Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J* 20:1411-1418

Zhao W. & Wang R. (2002) H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:474-480

Zhao W., Zhang J., Lu Y. & Wang R. (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 20:6008-6016

6.2 Internetverzeichnis

1 Universität Rostock - Medizinische Fakultät, Institut für Arbeitsmedizin (1999) Merkblatt zur BK Nr. 1202: Erkrankungen durch Schwefelwasserstoff; <http://arbmed.med.uni-rostock.de/bkvo/m1202.htm>; Stand 21.06.2010

2 Wassermann C. (2006) Schwefelwasserstoff.com; <http://www.schwefelwasserstoff.com/index.php?id=giftigkeit>; Stand 21.06.2010

7 Anhang

7.1 Bezugsquellen

Apamin	Fa. Sigma-Aldrich
Cyanoalanin	Fa. Sigma-Aldrich
D- und L-Cystein	Fa. Sigma-Aldrich
Fentanyl	Fa. Janssen
Glibenclamid	Fa. Sigma-Aldrich
Hydroxylamin	Fa. Sigma-Aldrich
Midazolam	Fa. Roche
Naloxon	Fa. Sigma-Aldrich
Natriumhydrogensulfid	Fa. Sigma-Aldrich
S-Adenosyl-L-Methionin	Fa. Sigma-Aldrich