

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
der Universität Würzburg
Direktor : Professor Dr. med. N. Roewer

**WIRKUNG DES BENZODIAZEPINS MIDAZOLAM AUF DIE
DÜNNDARMPERISTALTIK DES MEERSCHWEINCHENS IN VITRO**

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

vorgelegt von
Hardy Wenderoth
aus Großwallstadt

Würzburg, April 2002

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. med. M. K. Herbert

Korreferent: Herr Prof. Dr. med. W. Scheppach

Dekan: Herr Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2002

Der Promovend ist Arzt

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1	Versuchsaufbau.....	5
2.2	Versuchsdurchführung.....	9
2.3	Auswertungskriterien.....	10
2.4	Auswertungsschema.....	11
2.5	Kriterien der kompletten Hemmung.....	12
2.6	Statistisches Vorgehen.....	13
2.7	Medikamente und Wirkstoffe.....	15
3	ERGEBNISSE	18
3.1	Wirkung von Midazolam auf die Dünndarmperistaltik.....	18
3.2	Mechanismus der Midazolamwirkung.....	20
3.2.1	Versuch der Inhibition der Midazolamwirkung durch Zugabe von Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren vor Midazolamapplikation.....	20
3.2.1.1	Applikation eines Antagonisten an der zentralen Benzodiazepinbindungsstelle.....	21
3.2.1.2	Antagonisierung an der GABA _A -Bindungsstelle.....	21
3.2.1.3	Stimulation der Adenylatcyclase.....	22
3.2.1.4	Antagonisierung an opioidergen Rezeptoren.....	23
3.2.1.5	Antagonisierung an kalziumabhängigen K ⁺ -Kanälen..	25
3.2.1.6	Antagonisierung an kalziumabhängigen K ⁺ -Kanälen und opioidergen Rezeptoren.....	26
3.2.1.7	Antagonisierung an ATP-abhängigen K ⁺ -Kanälen.....	27
3.2.1.8	Simultanapplikation eines Antagonisten und Agonisten an ATP-abhängigen K ⁺ -Kanälen.....	28
3.2.1.9	Antagonisierung an der NO-Synthetase.....	28
3.2.2	Versuch der Inhibition der Midazolamwirkung durch Zugabe	

von Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren nach Midazolamapplikation.....	30
3.2.2.1 Applikation eines Antagonisten an der zentralen Benzodiazepinbindungsstelle.....	30
3.2.2.2 Stimulation der Adenylatcyclase.....	31
3.2.3 Versuch der Verstärkung der Midazolamwirkung durch Stimulation der vermuteten Wirkmechanismen und Bereit- stellung der Mediatoren.....	32
3.2.3.1 Applikation von Agonisten an ATP-abhängigen Kaliumkanälen.....	32
3.2.3.2 Applikation des Stickstoffmonoxid donors NaNP.....	34
4 DISKUSSION.....	38
4.1 Ziel der Untersuchung.....	38
4.2 Beurteilung des Versuchaufbaus, der Versuchsdurchführung und der Auswertungsparameter.....	38
4.3 Wirkung des Midazolams – Beurteilung der Wirkmechanismen.....	39
4.3.1 Wirkung an Kaliumkanälen.....	39
4.3.2 Wirkung an Ca ²⁺ -Kanälen, über Freisetzung von intra- zellulärem Ca ²⁺ bzw. Veränderung der Ca ²⁺ -Sensitivität.....	41
4.3.3 Wirkung über den zentralen Benzodiazepinrezeptor.....	42
4.3.4 Wirkung an GABA _A -Bindungsstellen.....	42
4.3.5 Wirkung über Inhibition der Adenylatcyclase.....	44
4.3.6 Wirkung über endogene opioiderge Mechanismen.....	45
4.3.7 Wirkung über Freisetzung von Stickstoffmonoxid.....	46
4.3.8 Schlußfolgerung.....	47
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	49
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	50
7 GRAPHISCHE DARSTELLUNGEN.....	59
8 DANKSAGUNG	
9 LEBENSLAUF	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE

ATP	Adenosintriphosphat
ΔP	Änderung des Schwellendrucks
ENS	Enterisches Nervensystem
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD	Glutamatsäuredecarboxylase
NANC	Non-adrenerg-non-cholinerg
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
Pa	Pascal
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
SEM	Standard error of the mean
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide
VL	Vorlauf
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Das Enterische Nervensystem (ENS) stellt einen erheblichen Teil unseres Gesamtnervensystems dar. Die Zahl der Ganglienzellen differiert mit etwa 10^8 nicht wesentlich von derjenigen des Rückenmarks beim Menschen (Furness und Costa, 1987). Es wurde bereits 1921 von Langley als dritte eigenständige Komponente des autonomen Nervensystems neben Sympathikus und Parasympathikus bezeichnet. Die enterischen Ganglien der einzelnen Plexus stehen untereinander in vielfältiger Verbindung und bilden damit ein flächenhaft ausgebreitetes „enterisches Gehirn“ (Wood, 1987). Die Analogie mit dem zentralnervösen Steuerorgan ergibt sich u. a. aus der Fähigkeit des Enterischen Nervensystems, die komplexen Vorgänge im Verdauungstrakt, wie z. B. Motilität des Darms, autonom, vom ZNS unabhängig, zu steuern. Zum anderen nimmt das ENS jedoch Impulse aus dem ZNS auf, um sie in die enterisch-motorischen Abläufe zu integrieren und beliefert rückläufig außerhalb des Verdauungstrakts gelegene Zentren wie die prävertebralen Ganglien und vermutlich das ZNS selbst. Die Funktion des ENS ist streng geknüpft an das Vorhandensein von motorischen und sensorischen Neuronen sowie den Interneuronen. Dadurch können lokale intramurale Regelkreise aufgebaut werden (Furness und Costa, 1987). Den zahlreich vorhandenen Interneuronen wird damit als Integrationsapparat die wichtige Funktion zugeschrieben, eine Verbindung zwischen sensorischen Signalen, welche Dehnung des Darmabschnitts sowie mechanische, thermische oder chemische Reizung der Schleimhaut registrieren, und der motorischen Antwort, z.B. Kontraktion der glatten Muskulatur, herzustellen. Auf diese Weise kommt durch rhythmisch abwechselnde und in einer Richtung fortlaufende Kontraktionen der glatten Muskulatur der Peristaltikreflex zustande, der zur oral-aboralen Propulsion des Darminhalts führt. Die Induktion geordneter peristaltischer Aktivität erfordert erregende und hemmende Einflüsse auf die glatte Muskulatur. Obwohl angenommen wurde, daß die erregenden Einflüsse auf die gastrointestinale Motilität hauptsächlich durch die Wirkung von Acetylcholin bedingt waren, fand man bei Blockade der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren weiterhin

peristaltische Aktivität (Kottegoda, 1970). Diese Beobachtung wies auf die Existenz sogenannter non-adrenerg-non-cholinerg Neurone hin. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, daß Substanz P und Neurokinin A die Haupttransmitter non-cholinerg Erregung sind (Barthó und Holzer, 1985; Maggi et al.,1993). Neben diesen erregenden NANC-Neuronen finden sich auch hemmend wirkende Fasern. Sie benutzen Stickstoffmonoxid (Rand, 1992; Sanders und Ward, 1992), das Neuropeptid VIP (Goyal et al.,1980), Adenosintriphosphat (Burnstock et al., 1970), Somatostatin, Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (Schwörer et al., 1992) und GABA (Davanger et al.,1987) als inhibitorische Neurotransmitter.

Nach Jessen et al. (1979), Harty und Franklin (1983) beweisen verschiedene Untersuchungen das Vorkommen, die Synthese und die Aufnahme von GABA in myenterische Plexus. Zudem konnte man die GAD, welche für die Konversion von Glutamatsäure zu GABA in GABAergen Neuronen verantwortlich ist, in isolierten myenterischen Plexus nachweisen.

Über die Beeinflussung der Affinität des inhibitorischen Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure an der GABA-Bindungsstelle im ZNS wirken die Benzodiazepine, wie das zur Gruppe der Imidazobenzodiazepine gehörige Midazolam (Abb. 1).

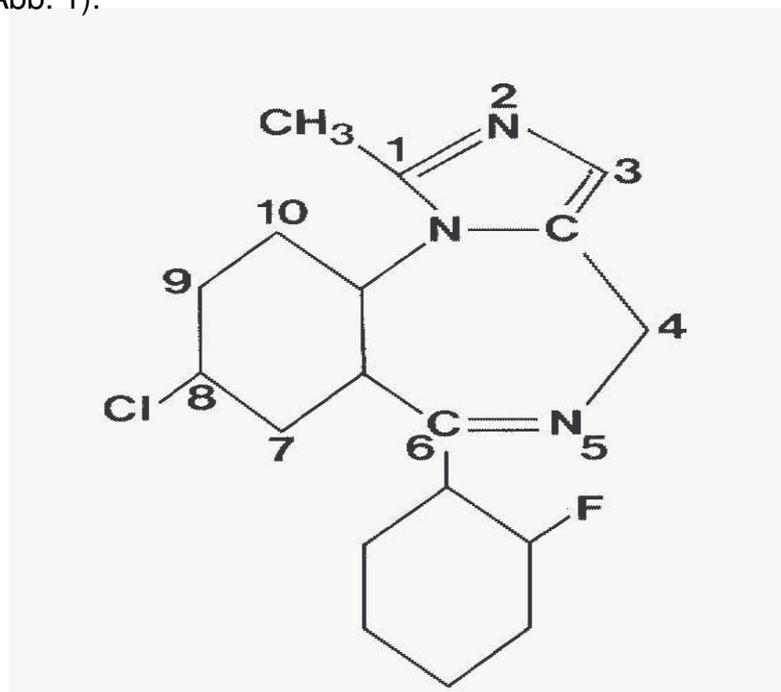


Abb. 1: Strukturformel des Midazolams

Sie binden an spezifische Stellen auf der Zellmembran, die nahe denen der GABA liegen. Die Bindung des Midazolams erhöht die Aktivität des wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitters GABA. Dieser führt durch Öffnung der Chloridkanäle zur Hyperpolarisation und damit zu einer verminderten Erregbarkeit der Neurone (Larsen, 1998) (Abb. 2).

Das 1984 in die Klinik eingeführte Benzodiazepin Midazolam ist für die Anaesthesiologie von großer Bedeutung. Aufgrund seiner für Benzodiazepine recht ungewöhnlichen Eigenschaft – seine Wasserlöslichkeit und seine kurze Eliminationshalbwertszeit – gehört das Midazolam zu den interessanten Verbindungen aus der Gruppe der Tranquilizer (Dudziak, 1985). Es besitzt sedative, anterograd amnestische, antikonvulsive, muskelrelaxierende und anxiolytische Eigenschaften (Larsen, 1998). Durch diese Fähigkeit des Midazolams eignet es sich zur Anwendung in vielen klinischen Situationen, welche unterschiedliche Grade einer Sedierung erfordern.

Die Sedierung ist ein wichtiger therapeutischer Ansatz bei der Behandlung von Intensivpatienten. Es ist bekannt, daß Medikamente, die unter anderem zur Langzeitsedierung appliziert werden, zu einer Störung der gastrointestinalen Motilität führen können (Zielmann und Grote, 1995). Nach Freye und Knuefermann (1994) hängt die postoperative Verzögerung der Darmmotilität unter anderem auch von der Narkoseart ab. Hierbei führen Anästhesien mit einer Opiat-Analgesie zu einer signifikanten Verlängerung der gastrointestinalen Passage. Über die Wirkungsmechanismen des Midazolams an der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes ist bisher wenig bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob Midazolam eine hemmende Wirkung auf die Dünndarmperistaltik hat. Zur Aufklärung der Mechanismen, über die Midazolam die peristaltische Aktivität beeinflusst, wurden erste orientierende Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden selektive Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren in Kombination mit dem Midazolam appliziert.

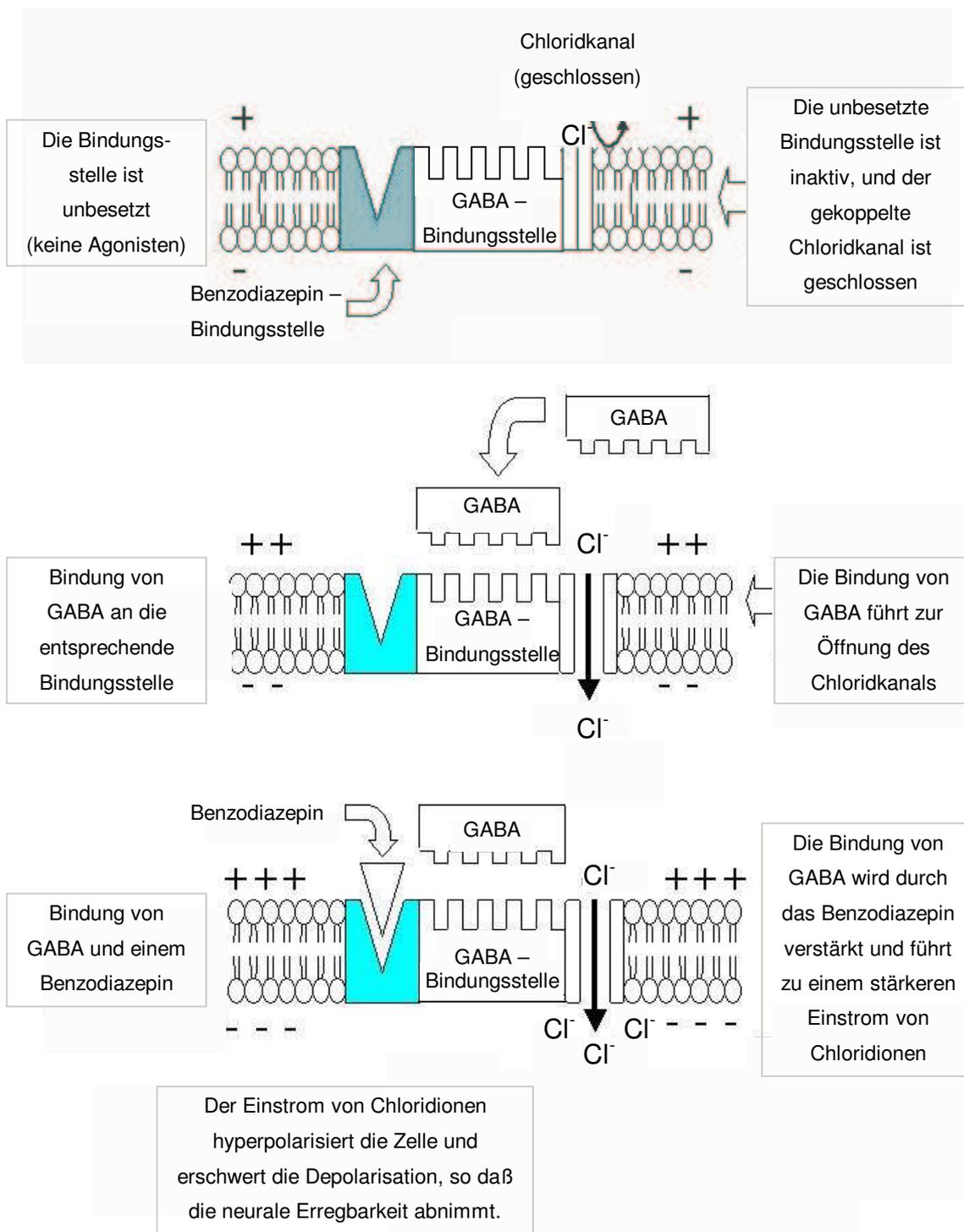


Abb. 2: Wirkungsmechanismus der Benzodiazepine:
 Die Bindung des Benzodiazepins an eine spezifische Bindungsstelle neben der für Gamma-Aminobuttersäure verstärkt die Wirkung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchung des Peristaltikreflexes *in vitro* wurde an Dünndarmsegmenten erwachsener weiblicher und männlicher Meerschweinchen durchgeführt. Die 350 bis 500 Gramm schweren Tiere (Lieferant Charles River, BFA-Stamm) wurden durch einen Genickschlag betäubt und anschließend durch Eröffnen der Karotiden entblutet. Nach Eröffnung des Peritoneums erfolgte die Präparation des distalen Jejunums und Ileums bis circa 10 cm proximal des ileocecalen Übergangs. Das aborale Ende wurde mit einem Faden markiert, um bei dem Anschließen der Perfusion im Tyrodebad die orthograde Peristaltik zu erhalten. Nach der Entnahme wurde das Dünndarmsegment sofort in 37°C vorgewärmte, mit 95% O₂ und 5% CO₂ oxygenierte Tyrodelösung gelegt, die vor Beginn jeder Versuchsdurchführung neu angesetzt wurde. Die Lösung enthielt (in mM): NaCl 136.9, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 11.9, NaH₂PO₄ 0.4 und Glucose 5.6. In isolierten Dünndarmsegmenten des Meerschweinchens kann peristaltische Aktivität durch Perfusion des intestinalen Lumens *in vitro* induziert werden (Trendelenburg, 1917). Infolgedessen wurde der entnommene Dünndarm dann in 8 bis 10 cm lange Segmente unterteilt, die dann in den verschiedenen Organbädern perfundiert wurden. Bei sorgfältig durchgeführter Dünndarmpräparation erlaubte die Versuchsanordnung die parallele Registrierung von 5 Segmenten (Abb. 4). Die Untersuchung der Peristaltik erfolgte mit einem nach Costall et al. (1993), Holzer und Maggi (1994) schon vorher im Detail beschriebenen Perfusionssystem. Die Dünndarmsegmente wurden an ihren oralen Enden mit der Zuleitung der Tyrodelösung verbunden (Abb. 4+5) und mit ihren aboralen Enden an den Y-Stücken befestigt (Abb. 4+5). Diese Anordnung wurde in ein 30 ml Tyrodelösung enthaltendes Organbad horizontal eingebracht (Abb. 4+5). Das Y-Stück ermöglichte auf dem einen Schenkel die Registrierung des intraluminalen Drucks mittels Druckaufnehmer (Abb. 4). Auf dem anderen Schenkel erlaubte es die

Entleerung der durch die Peristaltik ausgetriebenen intraluminalen Flüssigkeit aus einem 4 cm über dem Niveau des Dünndarmsegments liegenden Abflußröhrchen (Abb. 4) (Bülbring et al., 1958; Costall et al., 1993). Die Darmsegmente wurden mit 37°C vorgewärmter Tyrodelösung kontinuierlich mit 0.5 ml min^{-1} perfundiert. Diese Anordnung ermöglichte die peristaltische Entleerung der Segmente, sobald ein intraluminaler Druck von 400 Pa überschritten wurde.

Die kontinuierliche Zuleitung der Tyrodelösung (Abb. 4+5) bewirkt eine langsame Füllung des intestinalen Lumens (Abb. 3). Bei Erreichen einer bestimmten Druckschwelle (Abb. 3) wird eine aboralwärts gerichtete peristaltische Welle induziert und die intraluminalen Flüssigkeit aus dem Segment entleert. Diese stellt sich in dem von dem Druckaufnehmer aufgezeichneten Protokoll als ein spike-ähnlicher Anstieg (Abb. 3) des intraluminalen Drucks dar.

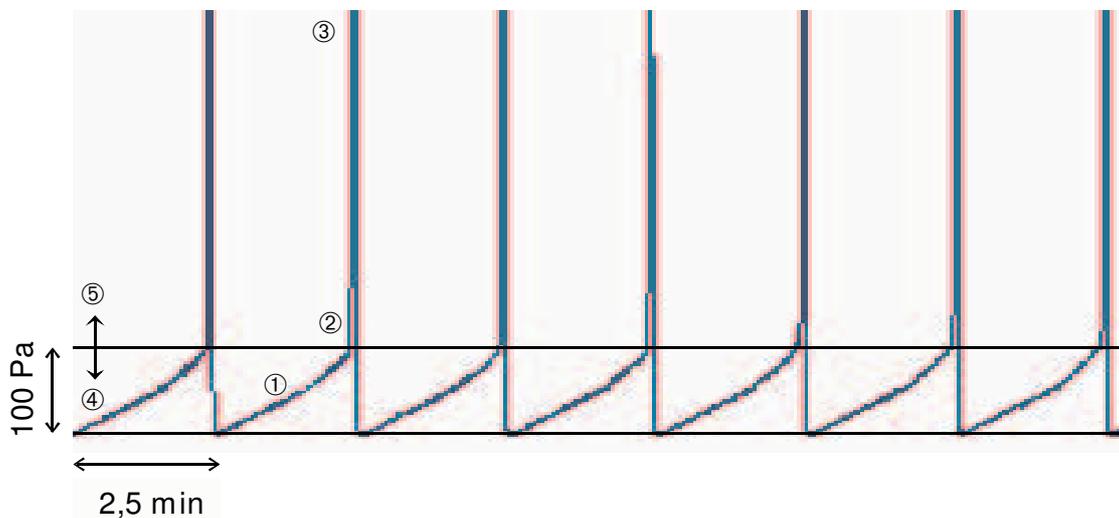


Abb 3 : Originalregistrierung der Änderung des intraluminalen Drucks eines Darm-segments bei kontinuierlicher Perfusion mit Tyrodelösung

- ① langsame Füllung des intestinalen Lumens
- ② Druckschwelle zur Auslösung der peristaltischen Welle
- ③ Entleerung des intestinalen Lumens durch die Peristaltik
- ④ Eine Erniedrigung des Schwellendrucks führt zu einer Stimulation der Peristaltik
- ⑤ Eine Erhöhung des Schwellendrucks führt zu einer Inhibition der Peristaltik

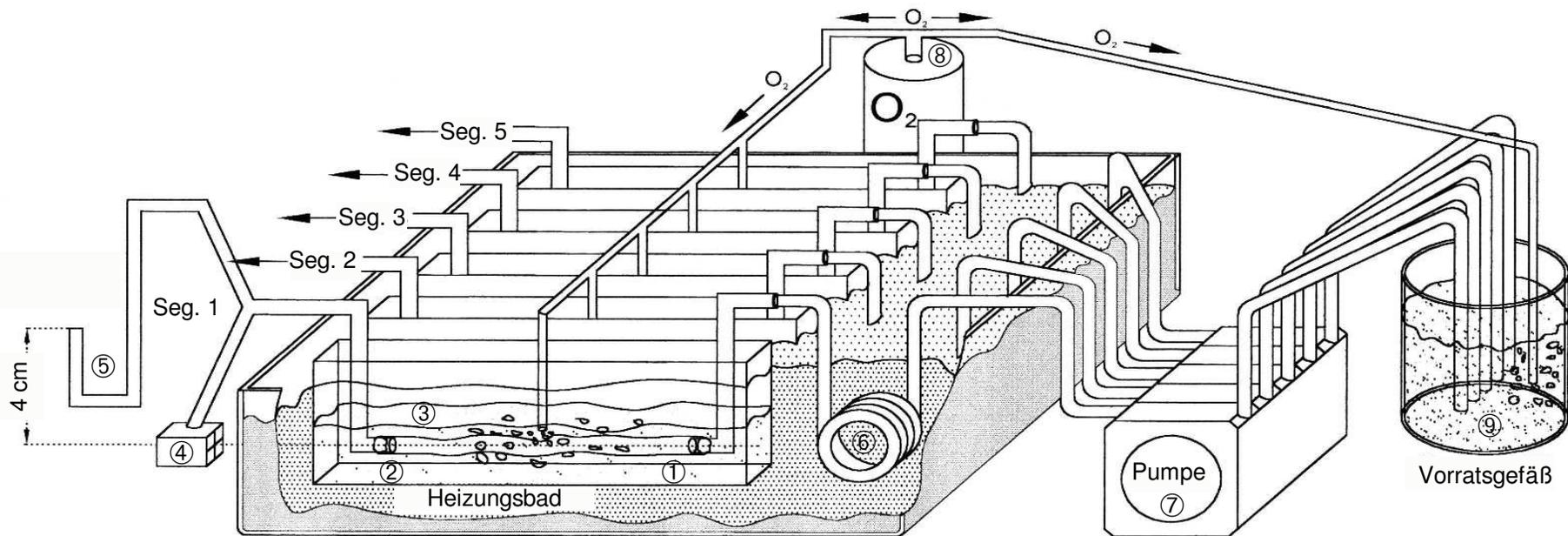


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

- ① Anschluß des oralen Endes des Dünndarmsegments an die kontinuierliche Zuleitung von Tyrodelösung ($0,5 \text{ ml min}^{-1}$)
- ② Anschluß des aboralen Endes des Dünndarmsegments an das Y-Stück (Druckaufnehmer + Abflußröhrchen)
- ③ Tyrodebad mit einer konstanten Temperatur von 37°C
- ④ Druckaufnehmer zur Online-Registrierung der intraluminalen Druckänderungen sowohl im PC als auch über einen x/y - Schreiber
- ⑤ Abflußröhrchen (bezüglich des Dünndarmniveaus höhenverstellbar) dient der Induktion spontaner peristaltischer Aktivität. Über das Abflußröhrchen erfolgt die Entleerung der durch die Peristaltik ausgetriebenen intraluminalen Flüssigkeit
- ⑥ Spiralförmig angeordnetes Schlauchsystem zur Erwärmung der Tyrodelösung
- ⑦ Pumpe, die eine kontinuierliche Perfusion des Dünndarmsegments von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ gewährleistet
- ⑧ Kontinuierliche Sauerstoffzufuhr in die verschiedenen mit Tyrodelösung gefüllten Organbäder
- ⑨ Vorratsgefäß für Tyrodelösung

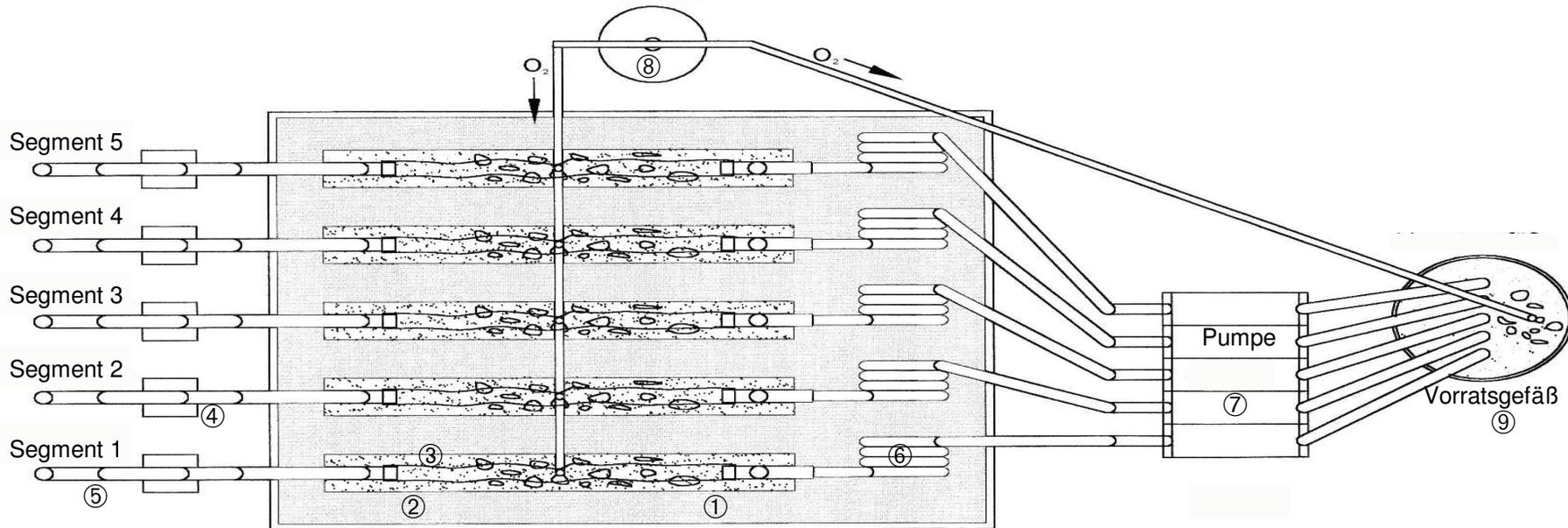


Abb. 5: Draufsicht auf den Versuchsaufbau

- ① Anschluß des oralen Endes des Dünndarmsegments an die kontinuierliche Zuleitung von Tyrodelösung ($0,5 \text{ ml min}^{-1}$)
- ② Anschluß des aboralen Endes des Dünndarmsegments an das Y-Stück (Druckaufnehmer + Abflußröhrchen)
- ③ Tyrodebad mit einer konstanten Temperatur von 37°C
- ④ Druckaufnehmer zur Online-Registrierung der intraluminalen Druckänderungen sowohl im PC als auch über einen x/y - Schreiber
- ⑤ Abflußröhrchen (bezüglich des Dünndarmniveaus höhenverstellbar) dient der Induktion spontaner peristaltischer Aktivität. Über das Abflußröhrchen erfolgt die Entleerung der durch die Peristaltik ausgetriebenen intraluminalen Flüssigkeit
- ⑥ Spiralförmig angeordnetes Schlauchsystem zur Erwärmung der Tyrodelösung
- ⑦ Pumpe, die eine kontinuierliche Perfusion des Dünndarmsegments von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ gewährleistet
- ⑧ Kontinuierliche Sauerstoffzufuhr in die verschiedenen mit Tyrodelösung gefüllten Organbäder
- ⑨ Vorratsgefäß für Tyrodelösung

2.2 Versuchsdurchführung

Nach Befestigen des oralen Endes des Dünndarmsegments mit der Zuleitung der Tyrodelösung (Abb. 4+5), des aboralen Endes mit dem Y-Stück (Abb. 4+5) und Einbringen des Segments in das auf 37°C vorgewärmte Tyrodebad (Abb. 4+5), wurde dies im Organbad 30 Minuten äquilibriert. Die Segmente wurden horizontal im Organbad positioniert, durchgespült und 10 Minuten nicht mit Tyrodelösung perfundiert. Anschließend wurde der Inhalt des Organbads ausgetauscht und die Dünndarmsegmente 20 Minuten perfundiert, bevor ein weiterer Wechsel der Tyrodelösung erfolgte. Nach Abschluß der 30-minütigen Äquilibrationsperiode wurde die Öffnung des Ausflußröhrchens um 4 cm bezüglich des Dünndarmniveaus angehoben (Abb. 4), um so den nötigen intraluminalen Druck zur Auslösung peristaltischer Aktivitäten zu erzeugen (Barthó und Holzer, 1995). Die ersten 30 Minuten der Registrierung dienten der Anpassung der Dünndarmsegmente an das neue Druckniveau. Die Applikation der zu testenden Pharmaka erfolgte, wenn das Darmsegment reguläre Peristaltik erreicht hatte. Kriterien für reguläre peristaltische Aktivität waren Regelmäßigkeit der peristaltischen Wellen bezüglich Frequenz, Schwellendruck und intraluminalen Druck nach der Entleerung der Darmsegmente (Abb. 3). Erst wenn 6 bis 10 stabile und kontinuierliche Kontraktionen, die wir als Vorlauf bezeichneten, registriert werden konnten, wurde die zu testende Substanz extraserosal in das Organbad appliziert. Das Volumen der applizierten Substanz betrug maximal 1% des Badvolumens (Holzer et al., 1995). Nach Zugabe einer Substanz als Einzel- oder Zweitapplikation wurde das Verhalten der Peristaltik über einen Zeitraum von 60 Minuten registriert und online sowohl auf einem x/y-Schreiber als auch im PC erfaßt. Bei Applikation zweier Substanzen betrug das Zeitintervall zwischen Erst- und Zweitapplikation 5, 10, jedoch meist 20 Minuten. Jede Substanzkombination wurde an mindestens 6 Darmsegmenten jeweils verschiedener Meerschweinchen getestet. Hierbei achtete man darauf, daß von proximal bis distal alle Abschnitte des Dünndarms untersucht wurden. Als Kontrollsubstanz diente Tyrodelösung, die keine Wirkung auf die Peristaltik hatte. 60 Minuten nach der letzten Applikation wurde der Versuch beendet.

2.3 Auswertungskriterien

Die zur Auslösung der peristaltischen Wellen nötige Druckschwelle wurde als Auswertungsparameter für die Effekte der applizierten Substanzen herangezogen (Costall et al., 1993; Holzer und Maggi, 1994). Eine Senkung des Schwellendrucks führt zu einer Stimulation (Abb. 3), ein Anstieg des Schwellendrucks zu einer Inhibition der Peristaltik bis zu einer vollständigen Aufhebung der intestinalen Motilität (Holzer et al., 1997) (Abb. 7).

2.4 Auswertungsschema

Die Auswertung der Kontraktionen erfolgte in 5-Minuten-Intervallen. Zur Quantifizierung der Schwellendruckänderung wurde die in den entsprechenden Intervallen jeweils letzte komplette Kontraktion verwendet und mit den Kontraktionen des Vorlaufs (Kontraktion – 5 und – 1 vor Substanzapplikation) verglichen.

Durch Ermittlung der Druckniveaus von 0 und 400 Pa konnte der intraluminale Druck durch Umrechnung zu jedem Zeitpunkt des Versuchs bestimmt werden. 0 Pa entsprachen dem Druck im Organbad auf Dünndarmniveau, 400 Pa dem Druck im Organbad bei 4 cm Wassersäule über dem Niveau des Darmsegments (Abb. 6).

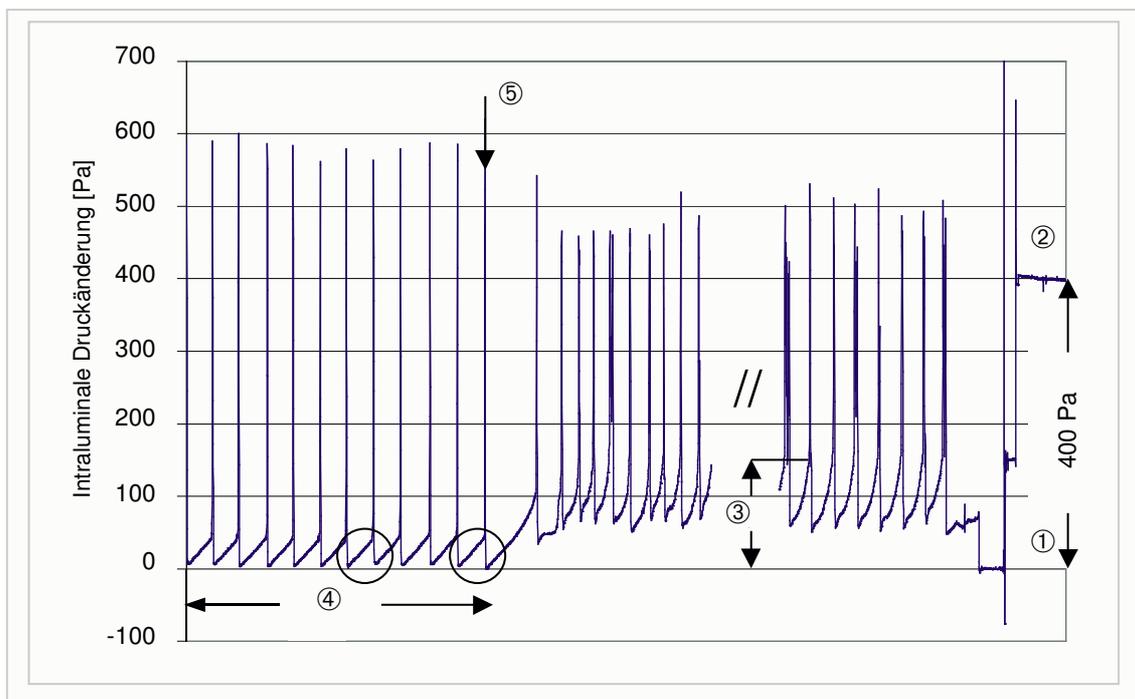


Abb 6 : Auswertung der online aufgezeichneten Originalregistrierungen

- ① 0 Pa Druckniveau
- ② 400 Pa Druckniveau
- ③ Differenz zwischen dem Druckniveau von 0 Pa und dem ermittelten Schwellendruck
- ④ nach 6 bis 10 regelmäßigen Kontraktionen (Vorlauf) erfolgt die Substanzapplikation ⑤. Die mit den Kreisen markierten Kontraktionen – 5 und – 1 des Vorlaufs dienen als Vergleichskontraktionen für die nachfolgenden Schwellendruckänderungen.

2.5 Kriterien der kompletten Hemmung

Die Aufhebung peristaltischer Aktivität der Dünndarmsegmente ließ sich anhand der aufgezeichneten Originalregistrierungen auf zwei verschiedene Arten dokumentieren. Nach Barthó und Holzer (1995) zeigt sich eine komplette Hemmung in einem Fehlen peristaltischer Aktivität der Dünndarmsegmente trotz eines intraluminalen Drucks von 400 Pa (Abb 7). Die Segmente liegen maximal dilatiert vor.

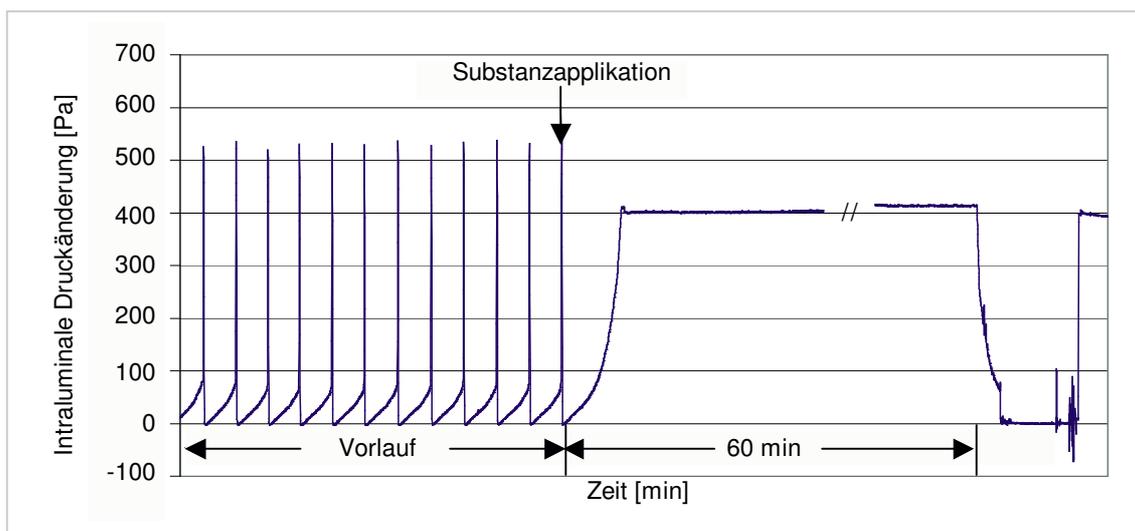


Abb. 7: Originalregistrierung einer kompletten Hemmung nach der Definition von Barthó und Holzer (1995)

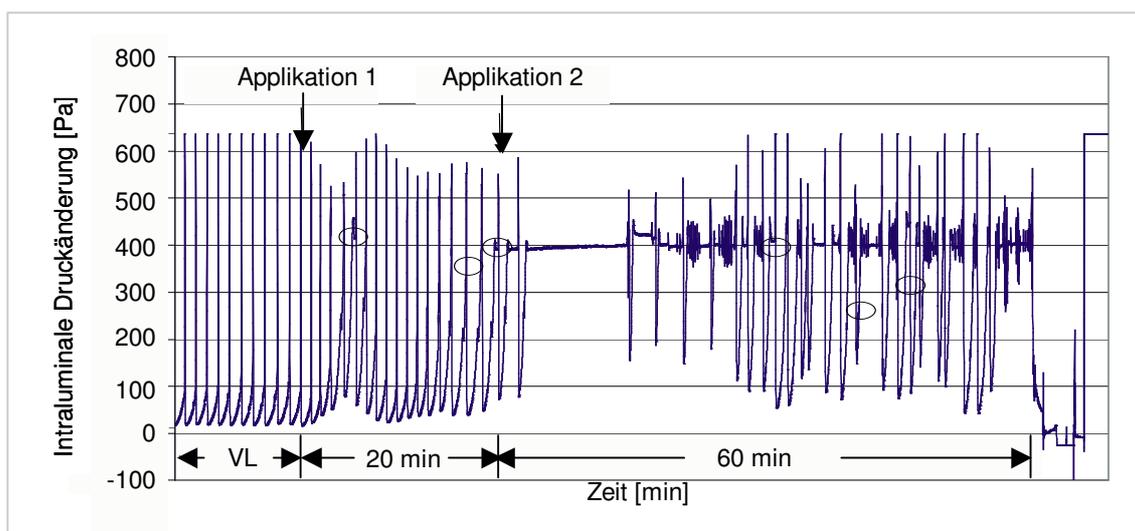


Abb. 8: Originalregistrierung einer kompletten Hemmung. Die Kontraktionen mit Schwellendrücken größer als 200 Pa führen zu unkoordinierten, segmentalen Wandbewegungen und zu keiner geordneten, aboral gerichteten Peristaltik. Beispiele hierfür sind mit Kreisen gekennzeichnet.

Die zweite Ausprägung der kompletten Hemmung lag vor, wenn der stark dilatierte Darm nur segmentale, unkoordinierte Bewegungen, als Faszikulationen bezeichnet, durchführte, die keiner regelhaften Peristaltik entsprachen und somit nicht zur Propulsion des Darminhalts führten (Abb 8).

Erste peristaltische Aktionen nach Induktion einer kompletten Hemmung der Dünndarmsegmente wurden als Spontanaktivität bezeichnet. Hierbei kommt es im Gegensatz zu den Faszikulationen zu einer Reduktion des intraluminalen Schwellendrucks unter 200 Pa (Abb 8).

2.6 Statistisches Vorgehen

Die ersten Schritte des statistischen Vorgehens beschäftigten sich mit dem Ziel der Datenreduktion. Hierzu wurden zu jedem Versuchszeitpunkt aus der Anzahl der Versuchsdurchführungen (Abb. 9+10) der arithmetische Mittelwert berechnet. Diese wurden dargestellt mit den dazugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte (Abb. 11). Eine weitere Datenreduktion erfolgte durch Berechnung des arithmetischen Mittelwerts über die verschiedenen Wirkzeiten nach Substanzapplikation (z.B. 20 und 60 Minuten). Die ermittelten Werte wurden mit dem entsprechenden Standardfehler des Mittelwerts in Form von Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 12).

Die statistische Auswertung auf Gleichheit der Grundgesamtheit erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-H-Tests. Je nach Größe der ermittelten Rangzahl-Differenzen wurde anschließend der entsprechende Versuch mit dem Kontrollversuch mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Hierbei wurde die ermittelte 2-seitige Überschreitungswahrscheinlichkeit nach Bonferroni korrigiert. Als Signifikanzniveau wurde 5% ($p < 0,05$) festgelegt.

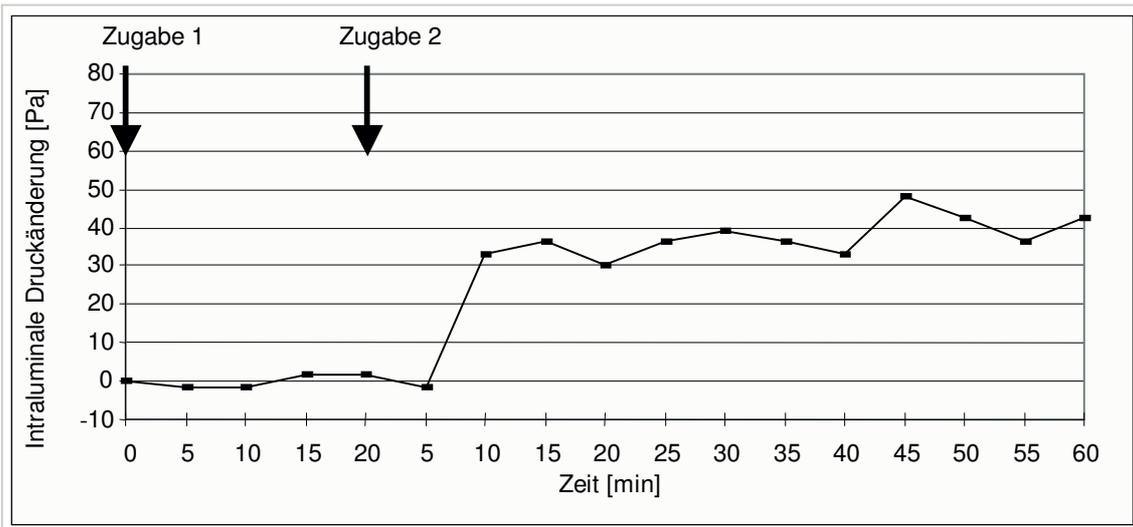


Abb. 9: Versuch 1: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Zugabe 1+2

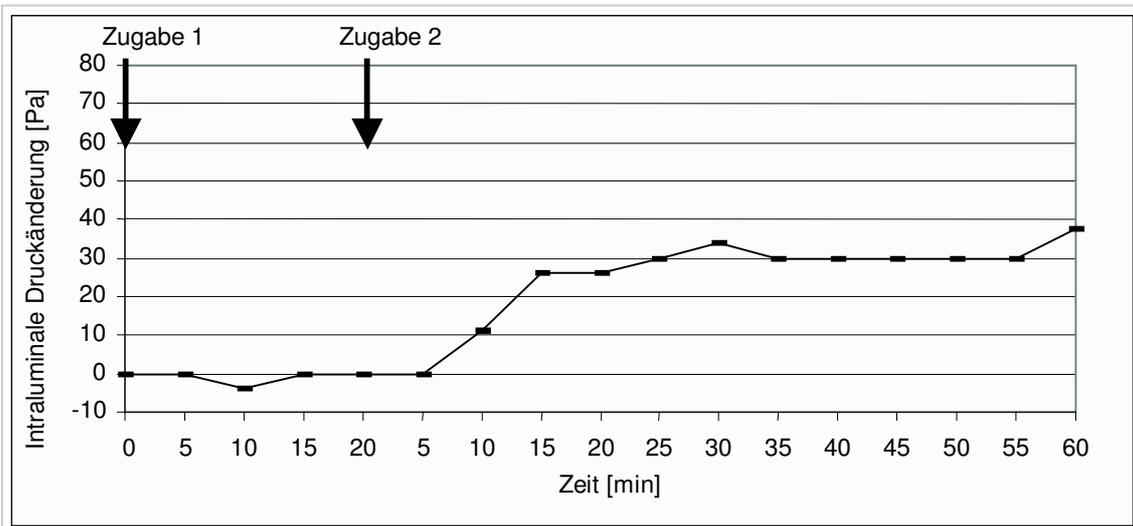


Abb. 10: Versuch 2: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Zugabe 1+2

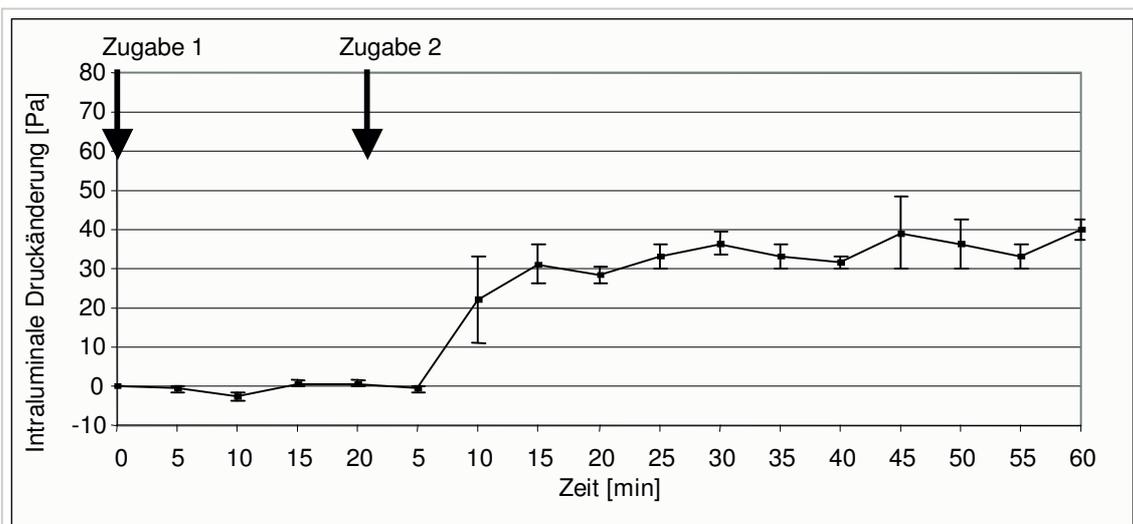


Abb. 11: Ergebnis der 1. Datenreduktion: Berechnung des arithmetischen Mittelwerts mit den dazugehörigen SEM aus Versuch 1 (Abb. 9) und Versuch 2 (Abb. 10)

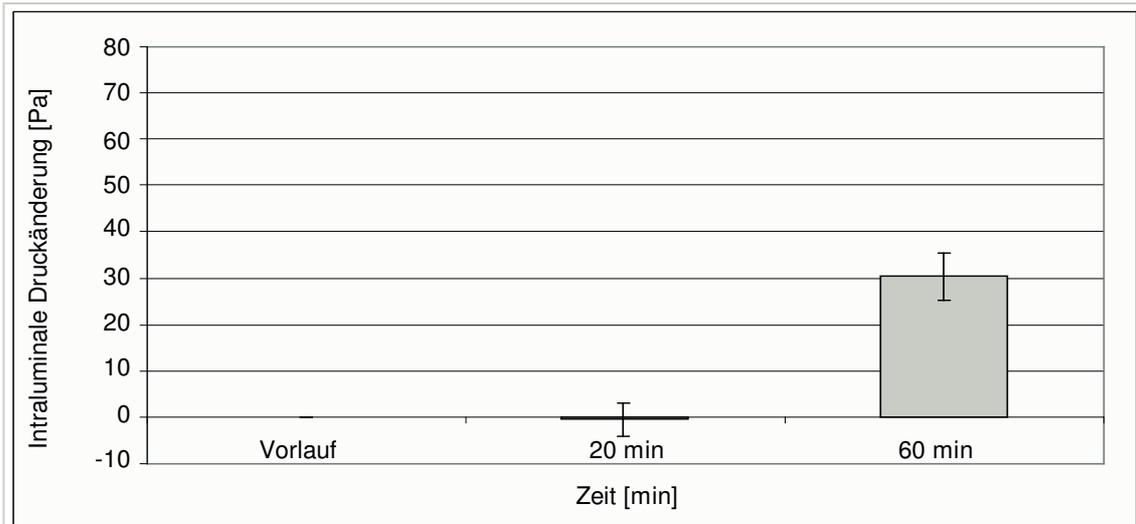


Abb. 12: Ergebnis der 2. Datenreduktion:
Berechnung des arithmetischen Mittelwerts mit den dazugehörigen SEM über die verschiedenen Wirkzeiten

2.7 Medikamente und Wirkstoffe in alphabetischer Reihenfolge

Apamin ist ein Antagonist an kalziumabhängigen Kaliumkanälen. Es ist ein aus 18 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Die Aminosäuren sind in einer C-terminalen Helix, die über zwei Disulfidverbindungen stabilisiert wird, angeordnet. Es wurde in einer 500 nM Badkonzentration getestet.

Bicuculline methochloride

[R- (R*,S*)]- 5-(6,8-Dihydro-8-oxofuro[3,4-e]-1,3-benzodioxol-6-yl)-5, 6, 7, 8-tetrahydro-6, 6- dimethyl-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinolinium chloride. Es ist ein Antagonist an der GABA_A-Bindungsstelle. Das Alkaloid wurde in einer 10 µM Badkonzentration getestet.

D-NAME N(G)-nitro-D-arginin-methylester ist das nicht wirksame Isomer des L-NAME. Es wurde in einer Badkonzentration von 300 µM getestet.

Flumazenil Ethyl (8-fluor-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a] [1,4] benzodiazepin-3-carboreylat) ist ein kompetetiver Antagonist an zentralen Benzodiazepinbindungsstellen. Es wurde in einer 1 μ M Badkonzentration getestet.

Glibenclamid

5-Chloro-N-[2-[4-[[[(Cylcohexylamino) carbonyl] amino] sulphonyl] phenyl] ethyl]-2-methoxybenzamide. Es ist ein antidiabetisch wirksamer Sulfonylharnstoff. Es wirkt als Antagonist an ATP-abhängigen Kaliumkanälen und wurde in einer 100 nM und 1 μ M Badkonzentration getestet.

LM-ZM Lösungsmittel des ZM226600. Es wurde in einer Menge von 300 μ l in das Organbad gegeben.

L-NAME NG-nitro-L-arginin-methylester ist ein nicht selektiver NO-Synthase-Inhibitor. Es wurde in einer 300 μ M Badkonzentration getestet.

Midazolam 8-Chlor-6-(2-fluorphenyl-1-methyl)-4H-imidazo[1,5a][1,4] benzo-diazepin, gehört zu der Gruppe der Imidazobenzodiazepine. Die zentrale Wirkung des Midazolams entsteht durch Besetzung spezifischer Benzodiazepinbindungsstellen, welche die hemmende Wirkung von GABA fördern. Es wurde an den Dünndarmsegmenten in Badkonzentrationen von 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M getestet.

Naloxon N-Allyl-4,5 α -epoxy-3,14-dihydroxy-6-morphinanon ist das Alkyl-derivat des Oxymorphon. Es ist ein spezifisch-kompetetiver Opiat-antagonist. Die Substanz wirkt kompetetiv antagonistisch an allen Opioidrezeptoren, weist jedoch die höchste Affinität zu den

μ -Rezeptoren auf. Es wurde an den Dünndarmsegmenten in einer 500 nM Badkonzentration getestet.

PACAP Pituitary adenylate cyclase-activating peptide ist ein hypothalamisches Peptid. Es wirkt über die Stimulation der Adenylatcyclase. Es wurde an den Dünndarmsegmenten in einer 3 nM Badkonzentration getestet.

Pinacidil (N-cyano-N'-(4-pyridyl)-N''-(1,2,2-trimethylpropyl)guanidine), ist ein ATP-abhängiger Kaliumkanalöffner. Es wurde in einer 10 μ M Badkonzentration getestet.

NaNP Natriumnitroprusside, ein Stickstoffmonoxid-donor, wurde in einer 10 μ M und 100 μ M Badkonzentration getestet.

Tyrodelösung

diente als Vergleichslösung. Diese enthielt (in mM): NaCl 136.9, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 11.9, NaH₂PO₄ 0.4 und Glucose 5.6. Im Kontrollversuch wurde von dieser „neutralen“ Lösung 30 μ l in das Organbad gegeben.

ZM226600 N-(4-Phenylsulphonylphenyl)-3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-2-methylpropanamide, ist ein potenter ATP-abhängiger Kaliumkanalöffner. Es wurde an den Dünndarmsegmenten in einer 100 nM und 1 μ M Badkonzentrationen getestet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von Midazolam auf die Dünndarmperistaltik

Sowohl Tyrodelösung als auch 0,1 μM und 1 μM Midazolam hatten keinen Einfluß auf die Peristaltik (Abb. 15, 30, 31, 32; Tab. 1).

Die Zugabe von 10 μM und 100 μM Midazolam induzierten eine im Vergleich zur Tyrodekontrollgruppe signifikante Erhöhung des Schwellendrucks ($p_{10\mu\text{M Midazolam}}=0,002$) (Abb. 13, 14, 15, 33, 34; Tab. 1). In keinem der Versuche induzierte 0,1 μM , 1 μM und 10 μM Midazolam eine komplette Hemmung.

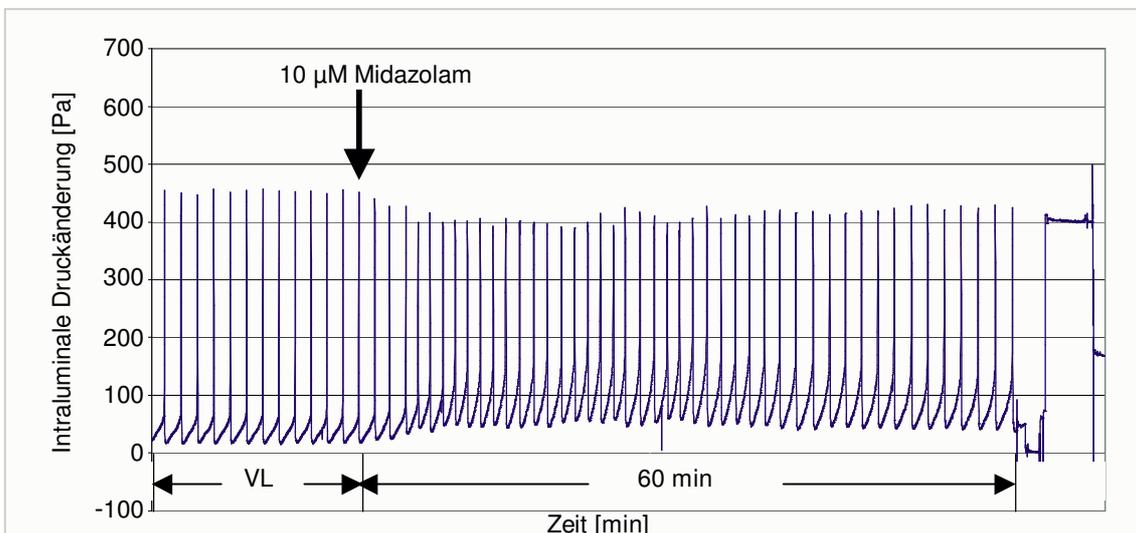


Abb. 13: Originalregistrierung einer Schwellendruckänderung nach Applikation von 10 μM Midazolam

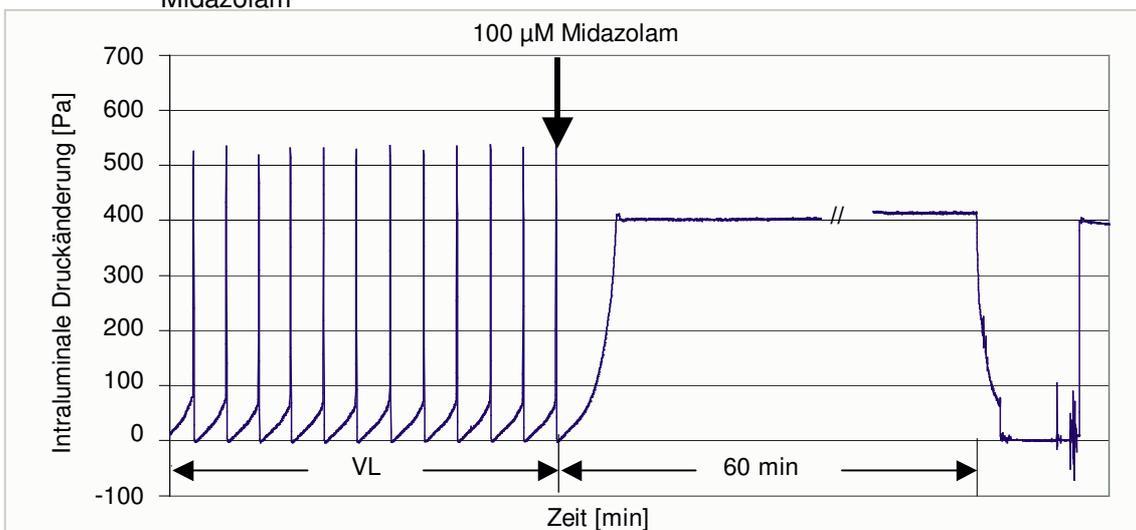


Abb. 14: Originalregistrierung einer kompletten Hemmung nach Applikation von 100 μM Midazolam

100 µM Midazolam führte in 4 von 4 Versuchen nach $4,4 \pm 0,4$ min zu einer kompletten Hemmung der Peristaltik. In allen Versuchen überdauerte die komplette Hemmung die Untersuchungszeit von 60 Minuten (Abb. 34).

Tab. 1: Tabellarische Darstellung der Schwellendruckänderungen über ein 60-Minuten-Intervall mit den entsprechenden SEM abhängig von der applizierten Substanz.

Substanz	Badkonzentration Substanzmenge	Schwellendruck- änderung [Pa]	SEM [Pa]
Tyrodelösung	30,0 µl	- 0,2	± 1,7
Midazolam	0,1 µM	- 1,2	± 1,9
Midazolam	1,0 µM	+ 5,2	± 3,0
Midazolam	10,0 µM	+ 46,0	± 10,3
Midazolam	100,0 µM	+ 359,2	± 5,5

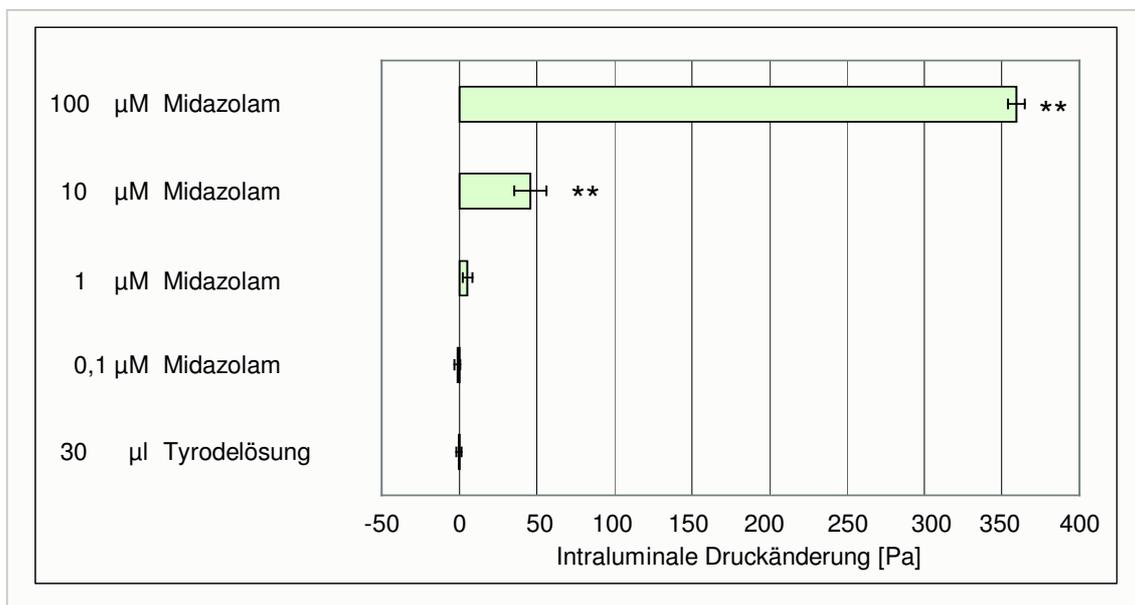


Abb. 15: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach der Applikation von 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM Midazolam und 30 µl Tyrodelösung bezogen auf den letzten Wert des Schwellendrucks vor der jeweiligen Substanzzugabe. ** steht für ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

3.2. Mechanismus der Midazolamwirkung

3.2.1 Versuch der Inhibition der Midazolamwirkung durch Zugabe von Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren vor Midazolamapplikation

Um zu ermitteln, über welche Mechanismen Midazolam auf die Dünndarmperistaltik wirkt, wurden selektive Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren 20 Minuten vor Midazolamgabe appliziert (Tab. 2).

Die erstapplizierten Substanzen Flumazenil, Bicuculline, Apamin, Glibenclamid, L-NAME und D-NAME hatten im Vergleich zur Tyrodekontrollgruppe keine Eigenwirkung auf die Darmperistaltik (Abb. 20, 21, 35, 36, 38, 40, 41, 43, 44; Tab. 3, 4, 8, 10, 12).

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der Versuchsdurchführungen

1. Applikation	Zeit [min]	2. Applikation	Zeit [min]	Kapitel
Tyrodelösung 30 µl	20	Midazolam 10 µM	60	
Flumazenil 1 µM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.1
Bicuculline 10 µM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.2
PACAP 3 nM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.3
Naloxon 500 nM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.4
Apamin 500 nM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.5
Naloxon 500 nM				
+ Apamin 500 nM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.6
Glibenclamid 100 nM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.7
Glibenclamid 1 µM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.7
Glibenclamid 1 µM				
+ Pinacidil 10 µM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.7
L-NAME 300 µM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.8
D-NAME 300 µM	20	Midazolam 10 µM	60	3.2.1.8

3.2.1.1 Applikation eines Antagonisten an der zentralen Benzodiazepin-bindungsstelle

Flumazenil hatte in einer 1 μM Badkonzentration keinen Einfluß auf die Peristaltik. Die Vorbehandlung des Darms mit 1 μM Flumazenil konnte die inhibitorischen Wirkung des 10 μM Midazolams nicht antagonisieren (Abb. 21, 35; Tab. 3).

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		ΔP	SEM	2. Applikation		ΔP	SEM
		[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]
Tyrodelösung	30 μl	-	2,7 \pm 1,6	Midazolam	10 μM	+ 46,4 \pm 7,5	
Flumazenil	1 μM	+	2,1 \pm 2,0	Midazolam	10 μM	+ 48,7 \pm 10,5	

3.2.1.2 Antagonisierung an der GABA_A-Bindungsstelle

Bicuculline hatte keine Eigenwirkung auf die peristaltische Aktivität (Abb. 36). Die Applikation des an der GABA_A – Bindungsstelle wirkenden Bicucullines in einer Badkonzentration von 10 μM konnte den Anstieg des Schwellendruckniveaus nach Zugabe von 10 μM Midazolam nicht reduzieren (Abb. 21, 36; Tab. 4)

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		ΔP	SEM	2. Applikation		ΔP	SEM
		[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]
Tyrodelösung	30 μl	-	2,7 \pm 1,6	Midazolam	10 μM	+ 46,4 \pm 7,5	
Bicuculline	10 μM	-	3,0 \pm 2,5	Midazolam	10 μM	+ 56,1 \pm 9,6	

3.2.1.3 Stimulation der Adenylatcyclase

Das 3 nM PACAP führte zu einer signifikanten Senkung des Schwellendrucks. Trotz dieser Eigenwirkung blieb bei 20-minütiger Vorbehandlung der Dünndarmsegmente mit 3 nM PACAP die hemmende Wirkung des 10 µM Midazolams auf die Peristaltik unbeeinflusst (Abb. 16, 21; Tab. 5).

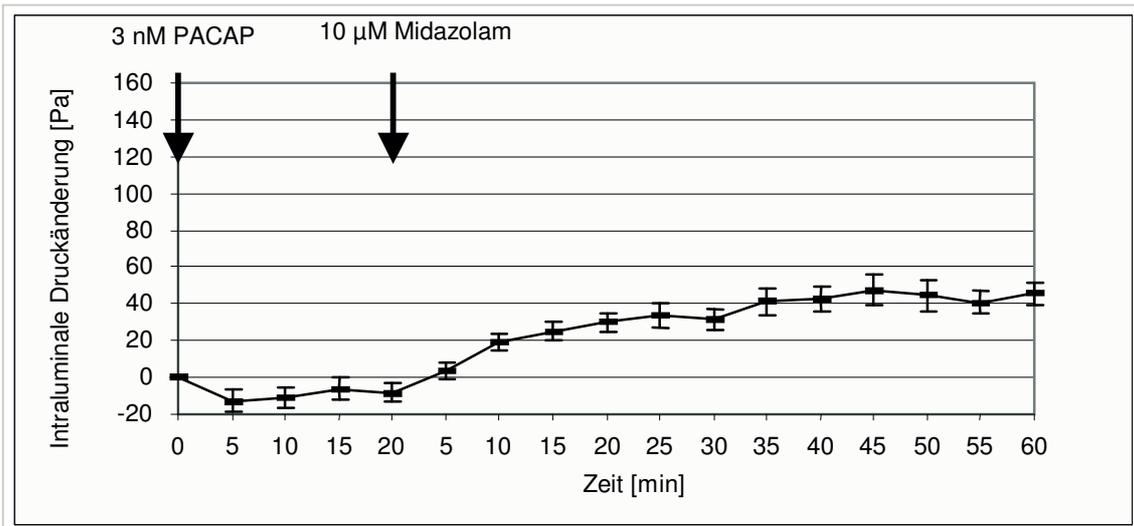


Abb. 16: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei Vorbehandlung mit 3 nM PACAP

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		ΔP	SEM	2. Applikation		ΔP	SEM
		[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]
Tyrodellösung	30 µl	-	2,7 ± 1,6	Midazolam	10 µM	+	46,4 ± 7,5
PACAP	3 nM	-	9,9 ± 3,7	Midazolam	10 µM	+	42,5 ± 3,3

3.2.1.4 Antagonisierung an opioidergen Rezeptoren

500 nM Naloxon hatte eine signifikant stimulierende ($p < 0,01$) Eigenwirkung auf die Peristaltik des Dünndarms. Es konnte die inhibitorische Wirkung des $10 \mu\text{M}$ Midazolams antagonisieren (Abb. 18, 21). Die Vorbehandlung des Darms mit 500 nM Naloxon führte im Vergleich zur Tyrodekontrollgruppe zu einem reduzierten Schwellendruckanstieg nach Midazolamapplikation (Abb. 17, 18, 21; Tab. 7).

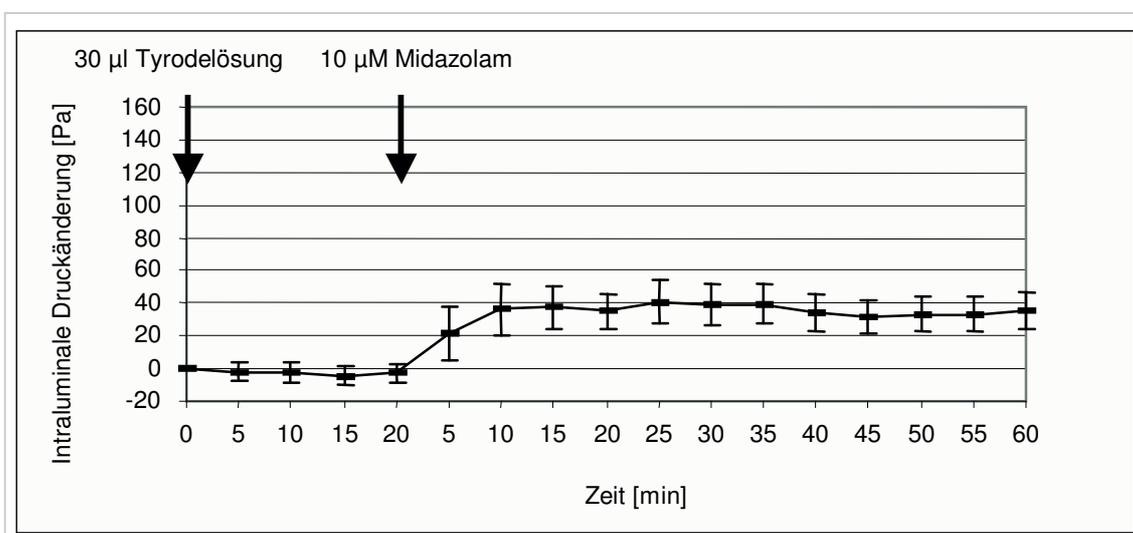


Abb. 17: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit $30 \mu\text{l}$ Tyrodelösung

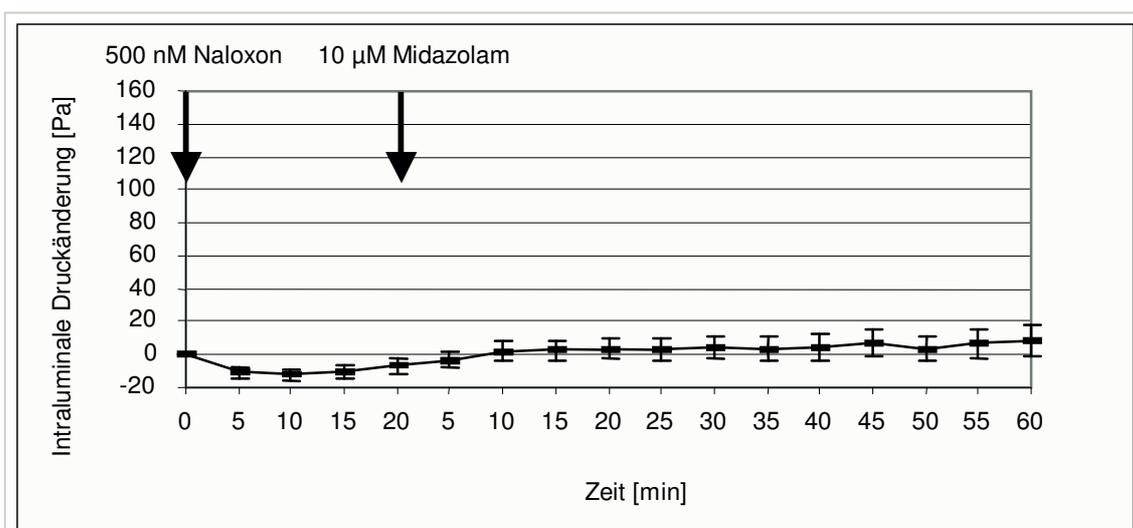


Abb. 18: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 500 nM Naloxon

Die Vorbehandlung der Dünndarmsegmente mit 500 nM Naloxon bei anschließender Applikation von 100 μ M Midazolam führte zu keiner Änderung der Latenz bis zur Ausprägung der kompletten Hemmung (Abb. 37; Tab. 6).

Tab. 6: Tabellarische Darstellung der Latenz von der Applikation der Substanz bis zur Ausprägung der kompletten Hemmung mit den entsprechenden SEM

Versuch				Latenz bis zur kompl. Hemmung [min]	SEM [min]
Tyrodelösung	30 μ l	-20 min-	Midazolam 100 μ M	5,9	\pm 0,3
Naloxon	500nM	-20 min-	Midazolam 100 μ M	6,1	\pm 0,4
Apamin	500nM	-20 min-	Midazolam 100 μ M	5,4	\pm 0,3
Apamin	500nM	-20 min-	Midazolam 100 μ M	5,9	\pm 0,4

In nur einem von 6 Versuchen (16,7%) überdauerte die komplette Hemmung die Untersuchungszeit von 60 Minuten, vergleichbar mit der in der Tyrodekontrollgruppe. Nach $45,6 \pm 0,2$ Minuten fanden sich in 2 von 6 Versuchen (33,3%) Faszikulationen, zu spontaner Aktivität kam es nicht. In 3 von 6 Versuchen (50%) traten nach $22,5 \pm 13,0$ Minuten erste Faszikulationen und nach $34 \pm 15,8$ Minuten Spontanaktivität auf (Abb. 19).

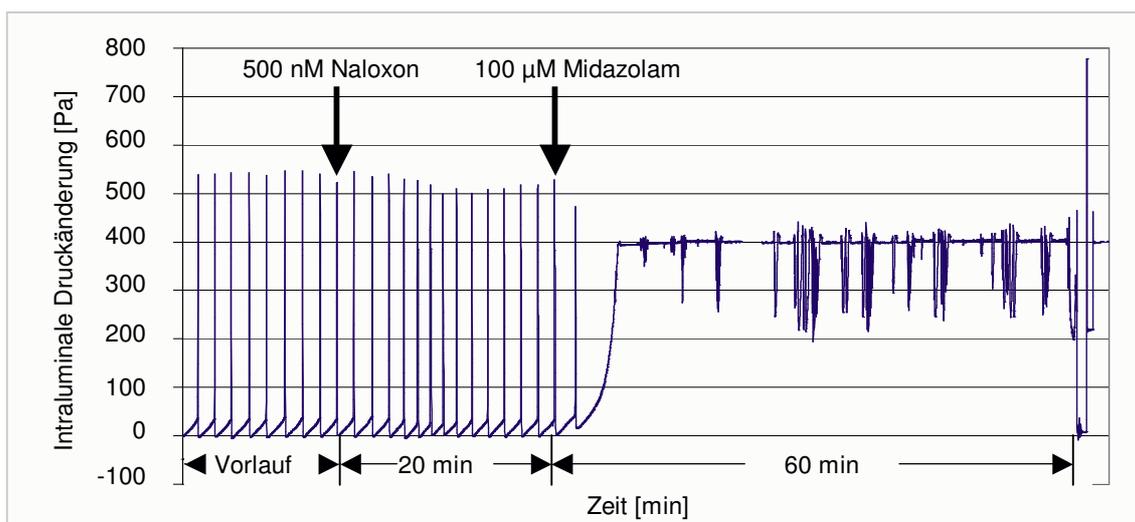


Abb. 19: Originalregistrierung einer kompletten Hemmung nach Applikation von 100 μ M Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung des Darms mit 500 nM Naloxon

In keinem der 6 Versuche führte die Erstapplikation von 500 nM Naloxon 20 Minuten vor der Midazolamgabe in einer Badkonzentration von 100 μM zu einer Recovery (Abb. 19, 37).

Tab. 7: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		ΔP	SEM	2. Applikation		ΔP	SEM
		[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]
Tyrodellösung	30 μl	-	2,7 \pm 1,6	Midazolam	10 μM	+	46,4 \pm 7,5
Naloxon	500 nM	-	9,6 \pm 1,5	Midazolam	10 μM	+	12,0 \pm 3,6
Tyrodellösung	30 μl	-	2,9 \pm 2,6	Midazolam	100 μM	+	361,5 \pm 7,0
Naloxon	500 nM	-	8,9 \pm 1,1	Midazolam	100 μM	+	370,8 \pm 2,4

3.2.1.5 Antagonisierung an kalziumabhängigen Kaliumkanälen

Das 500 nM Apamin hatte keine Eigenwirkung. Hingegen induzierte die Applikation von 500 nM Apamin eine signifikante Reduktion der inhibitorischen Wirkung des Midazolams. Jedoch war die Intensität der Reduktion unter 500 nM Naloxon ausgeprägter als unter 500 nM Apamin (Abb. 17, 18, 20, 21; Tab. 8).

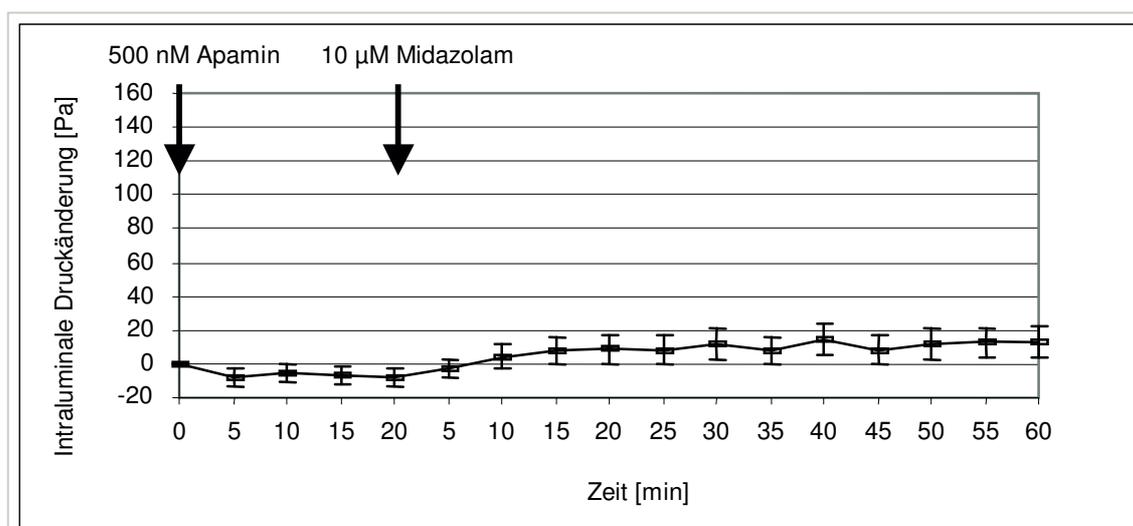


Abb. 20: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 μM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 500 nM Apamin

Die Vorbehandlung des Dünndarms mit 500 nM Apamin induzierte nach Applikation von 100 µM Midazolam im Vergleich zur Tyrodekontrollgruppe keine signifikante Verlängerung der Latenz bis zur Ausprägung der kompletten Hemmung (Abb. 38; Tab. 6).

In 3 von 6 (50%) Versuchen überdauerte die komplette Hemmung die Untersuchungszeit von 60 Minuten ohne Fazikulationen und Spontanaktivität. In 2 von 6 Versuchen (33,3%), in denen es nach $30,8 \pm 0,3$ Minuten zu Faszikulationen kam, fand man $38,8 \pm 0,8$ Minuten nach kompletter Hemmung eine spontane Aktivität der Dünndarmmotilität. Ein Faszikulieren ohne Anzeichen spontaner Aktivität zeigte sich in nur 1 von 6 Versuchen (16,7%). Eine Rückkehr regelhafter Peristaltik konnte auch hier nicht beobachtet werden.

Tab. 8: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		ΔP [Pa]	SEM [Pa]	2. Applikation		ΔP [Pa]	SEM [Pa]
Tyrodelösung	30 µl	-	$2,7 \pm 1,6$	Midazolam	10 µM	+	$46,4 \pm 7,5$
Apamin	500 nM	-	$4,8 \pm 1,6$	Midazolam	10 µM	+	$17,5 \pm 4,1$
Tyrodelösung	30 µl	-	$2,9 \pm 2,6$	Midazolam	100 µM	+	$361,5 \pm 7,0$
Apamin	500 nM	-	$4,0 \pm 0,6$	Midazolam	100 µM	+	$363,8 \pm 4,8$

3.2.1.6 Antagonisierung an kalziumabhängigen Kaliumkanälen und opioidergen Rezeptoren

Die Simultanapplikation von 500 nM Apamin und 500 nM Naloxon hatte keine Eigenwirkung auf die Dünndarmperistaltik (Abb. 39; Tab 9).

Ebenso wie die Einzelapplikationen induzierte auch die Simultanapplikation der beiden Substanzen keine signifikante Verlängerung der Latenz bis zur Ausprägung der kompletten Hemmung. Die Induktion einer kompletten Hemmung konnte durch die Zugabe von 500 nM Apamin und 500 nM Naloxon

nicht antagonisiert werden. In allen Versuchen kam es nach der Applikation von 100 µM Midazolam zu einem kompletten Stillstand der peristaltischen Aktivität. In 5 von 6 Versuchen (83,3%) konnten nach Ausbildung der kompletten Hemmung nach $17,6 \pm 4,2$ Minuten Faszikulationen und nach $39,1 \pm 11,4$ Minuten Spontanaktivität beobachtet werden. In keinem der 6 Versuche ließen sich die spontanen Darmaktivitäten in eine regelmäßige Peristaltik überführen.

Tab. 9: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation			ΔP	SEM	2. Applikation			ΔP	SEM
			[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]	
Tyrodelösung	30 µl	-	$2,9 \pm$	2,6	Midazolam 100 µM	+	$361,5 \pm$	7,0	
Naloxon	500 nM								
+ Apamin	500 nM	-	$6,1 \pm$	3,8	Midazolam 100 µM	+	$363,8 \pm$	5,8	

3.2.1.7 Antagonisierung an ATP-abhängigen Kaliumkanälen

Die Applikation von 100 nM und 1 µM Glibenclamid hatte keine Eigenwirkung auf die Peristaltik. Die Erhöhung des Schwellendruckniveaus nach Applikation von 10 µM Midazolam wurde durch die 20-minütige Vorbehandlung des Darms mit Glibenclamid in den beiden Badkonzentrationen nicht antagonisiert (Abb. 21, 40, 41; Tab. 10).

Tab. 10: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation			ΔP	SEM	2. Applikation			ΔP	SEM
			[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]	
Tyrodelösung	30 µl	-	$2,7 \pm$	1,6	Midazolam 10 µM	+	$46,4 \pm$	7,5	
Glibenclamid	100 nM	-	$3,7 \pm$	2,1	Midazolam 10 µM	+	$56,0 \pm$	10,8	
Glibenclamid	1 µM	-	$2,5 \pm$	1,2	Midazolam 10 µM	+	$52,6 \pm$	8,3	

3.2.1.8 Simultanapplikation eines Antagonisten und Agonisten an ATP-abhängigen Kaliumkanälen

Die Simultanapplikation des ATP-abhängigen Kaliumkanalblockers Glibenclamid in einer 1 μM Badkonzentration mit dem ATP-abhängigen Kaliumkanalöffner Pinacidil in einer 10 μM Badkonzentration hatte keine Eigenwirkung. Die Vorbehandlung der Darmsegmente mit dieser Substanzkombination konnte die inhibitorische Wirkung des Midazolams nicht beeinflussen (Abb. 21, 42; Tab. 11).

Tab. 11: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		ΔP	SEM	2. Applikation		ΔP	SEM
		[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]
Tyrodelösung	30 μl	-	2,7 \pm 1,6	Midazolam	10 μM	+	46,4 \pm 7,5
Glibenclamid	1 μM						
+ Pinacidil	10 μM	-	1,2 \pm 1,0	Midazolam	10 μM	+	51,6 \pm 12,5

3.2.1.9 Antagonisierung an der Stickstoffmonoxidsynthetase

Zur Überprüfung, ob die Midazolamwirkung über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid als Mediator vermittelt wird, wurden der nicht selektive Inhibitor der NO-Synthetase L-NAME und dessen nicht wirksames Isomer D-NAME 20 Minuten vor Midazolamgabe appliziert (Tab. 2).

L-NAME und D-NAME hatten keine Eigenwirkung auf die peristaltische Aktivität. Auch die Vorbehandlung der Darmsegmente führte zu keiner Antagonisierung der hemmenden Wirkung des 10 μM Midazolams (Abb. 21, 43, 44; Tab. 12).

Tab. 12: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation	ΔP [Pa]	SEM [Pa]	2. Applikation	ΔP [Pa]	SEM [Pa]
Tyrodellösung 30 μ l	- 2,7 \pm 1,6		Midazolam 10 μ M	+ 46,4 \pm 7,5	
L-NAME 300 μ M	+ 2,1 \pm 4,5		Midazolam 10 μ M	+ 38,8 \pm 7,3	
D-NAME 300 μ M	+ 1,5 \pm 1,1		Midazolam 10 μ M	+ 43,8 \pm 9,0	

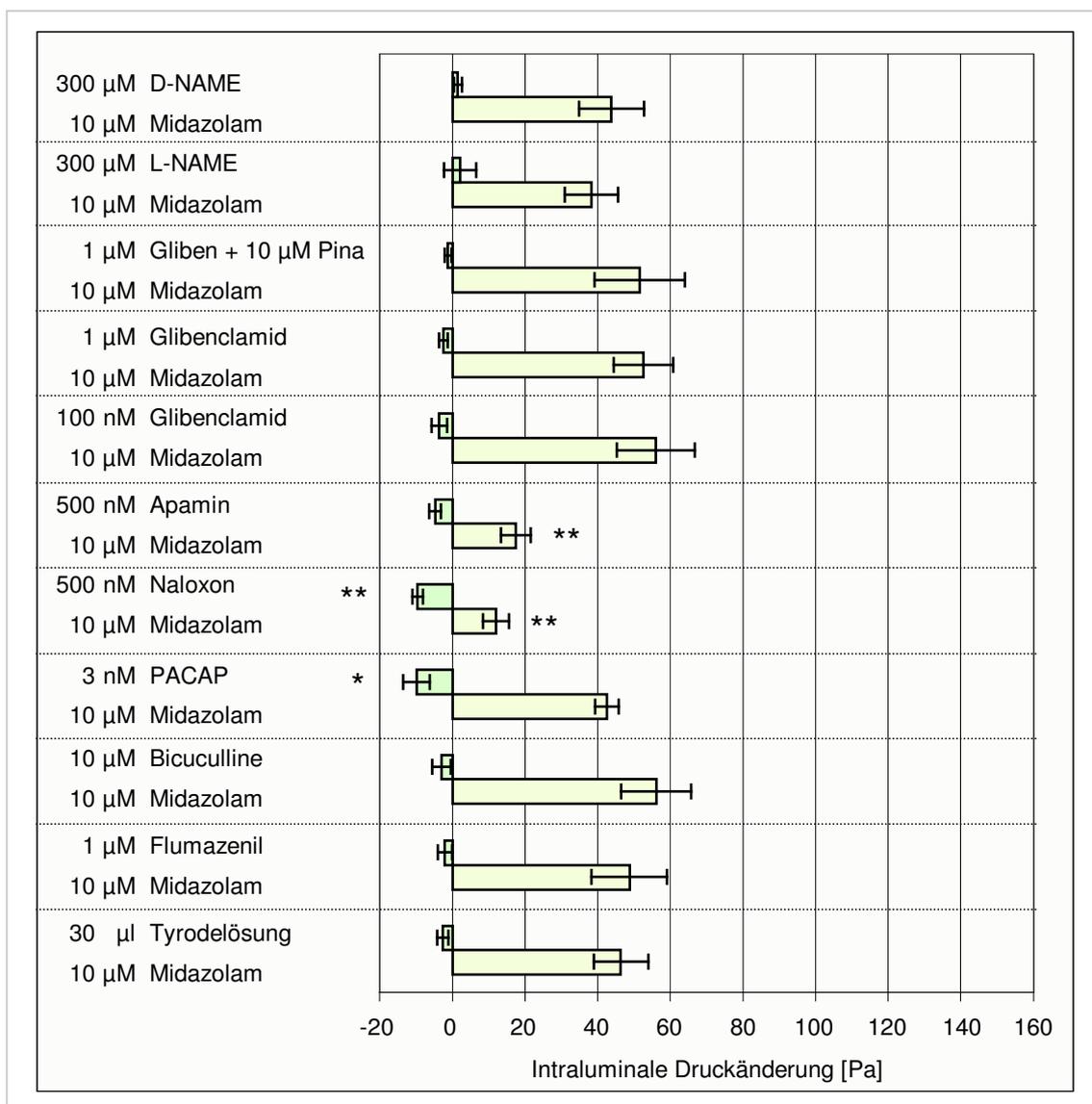


Abb. 21: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach der Erstapplikation und der Zugabe von 10 μ M Midazolam bezogen auf den letzten Wert des Schwellendrucks vor der jeweiligen Substanzzugabe. * steht für ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$, ** für ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

3.2.2 Versuch der Inhibition der Midazolamwirkung durch Zugabe von Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren nach Midazolamapplikation

Der Applikation des Midazolams folgte nach einem Zeitintervall von 10 bzw. 20 Minuten die Zugabe der antagonisierenden Substanz (Tab. 13). Als Vergleichssubstanz diente Tyrodelösung.

Tab. 13: Tabellarische Darstellung der Versuchsdurchführungen

1. Applikation	Zeit [min]	2. Applikation	Zeit [min]	Kapitel
Midazolam 10 μ M	20	Tyrodelösung 30 μ l	60	
Midazolam 10 μ M	10	Flumazenil 1 μ M	60	3.2.2.1
Midazolam 10 μ M	20	PACAP 3 nM	60	3.2.2.2

3.2.2.1 Applikation eines Antagonisten an der zentralen Benzodiazepin-bindungsstelle

Die Applikation von 1 μ M Flumazenil führte im Vergleich zur Tyrodekontrollgruppe zu keiner signifikanten Änderung des Schwellendrucks (Abb. 22; Tab. 14).

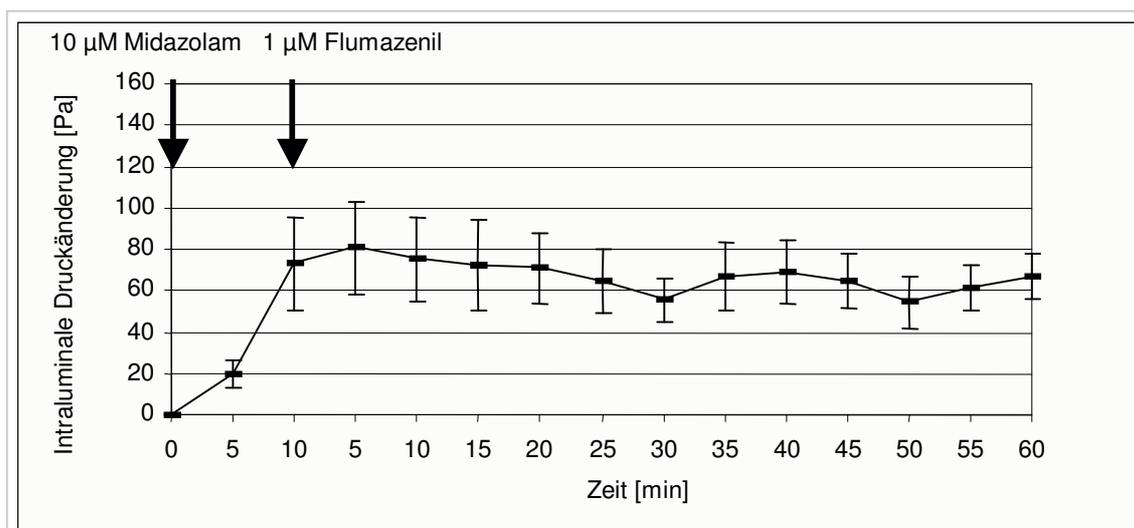


Abb. 22: Registrierung der intraluminale Druckänderung [Pa] nach Applikation von 1 μ M Flumazenil bei 10-minütiger Vorbehandlung mit 10 μ M Midazolam

Tab. 14: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation			ΔP	SEM	2. Applikation			ΔP	SEM
			[Pa]	[Pa]				[Pa]	[Pa]
Midazolam	10	μM	+ 52,6	$\pm 17,9$	Tyrodellösung	30	μl	- 4,1	$\pm 2,1$
Midazolam	10	μM	+ 46,5	$\pm 10,7$	Flumazenil	1	μM	- 6,2	$\pm 14,4$

3.2.2.2 Stimulation der Adenylatcyclase

Auch die Zugabe von 3 nM PACAP konnte die inhibitorische Wirkung des Midazolams nicht antagonisieren (Abb. 23; Tab. 15).

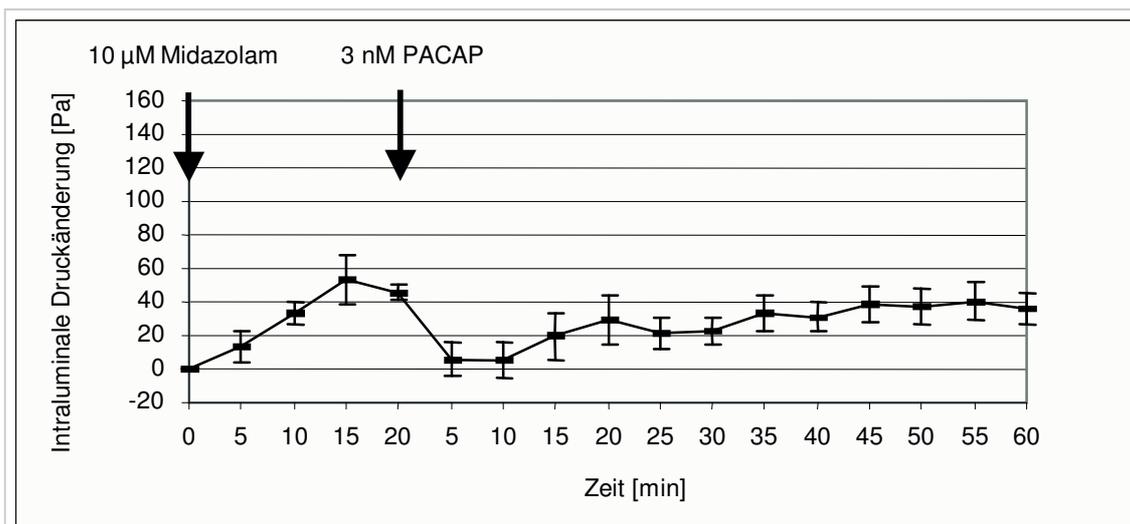


Abb. 23: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 3 nM PACAP bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 10 μM Midazolam

Tab. 15: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation			ΔP	SEM	2. Applikation			ΔP	SEM
			[Pa]	[Pa]				[Pa]	[Pa]
Midazolam	10	μM	+ 52,6	$\pm 17,9$	Tyrodellösung	30	μl	- 4,1	$\pm 2,1$
Midazolam	10	μM	+ 36,5	$\pm 7,8$	PACAP	3	nM	- 12,3	$\pm 15,3$

3.2.3 Versuch der Verstärkung der Midazolamwirkung durch Stimulation der vermuteten Wirkmechanismen und Bereitstellung der Mediatoren

3.2.3.1 Applikation von Agonisten an ATP-abhängigen Kaliumkanälen

Zur Aufklärung, ob Midazolam über ATP-abhängige Kaliumkanäle wirkt, und deren Öffnung somit zu einer Wirkungsverstärkung führt, wurde der Midazolamapplikation eine 5- bzw. 20-minütige Exposition des Darms gegenüber Agonisten an ATP-abhängigen Kaliumkanälen vorgeschaltet (Tab. 16).

Tab. 16: Tabellarische Darstellung der Versuchsdurchführungen

1. Applikation		Zeit [min]	2. Applikation		Zeit [min]
Tyrodelösung	30 µl	20	Midazolam	10 µM	60
Pinacidil	10 µM	05	Midazolam	10 µM	60
Pinacidil	10 µM	20	Midazolam	10 µM	60
ZM226600	100 nM	20	Midazolam	10 µM	60
ZM226600	1 µM	20	Midazolam	10 µM	60
LM-ZM	300 µl	20	Midazolam	10 µM	60

Die ATP-abhängigen Kaliumkanalöffner Pinacidil und ZM226600 hatten im Vergleich zur Tyrodekontrollgruppe keine Eigenwirkung auf die Darmperistaltik. Die Vorbehandlung der Darmsegmente mit diesen Substanzen führte zu keiner Verstärkung der inhibitorischen Wirkung des 10 µM Midazolams (Abb. 24, 45-48, Tab. 17).

Tab. 17: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		Δ P [Pa]	SEM [Pa]	2. Applikation		Δ P [Pa]	SEM [Pa]
Tyrodelösung	30 µl	-	2,7 ± 1,6	Midazolam	10 µM	+	46,4 ± 7,5
Pinacidil ^{05min}	10 µM	-	1,0 ± 2,3	Midazolam	10 µM	+	66,9 ± 28,0

Pinacidil ^{20min}	10 µM	-	0,5 ± 1,2	Midazolam	10 µM	+	57,0 ± 8,9
ZM226600	100 nM	-	1,3 ± 3,1	Midazolam	10 µM	+	61,0 ± 12,2
ZM226600	1 µM	-	1,8 ± 1,1	Midazolam	10 µM	+	37,2 ± 4,8
LM-ZM	300 µl	-	8,7 ± 2,6	Midazolam	10 µM	+	58,4 ± 11,2

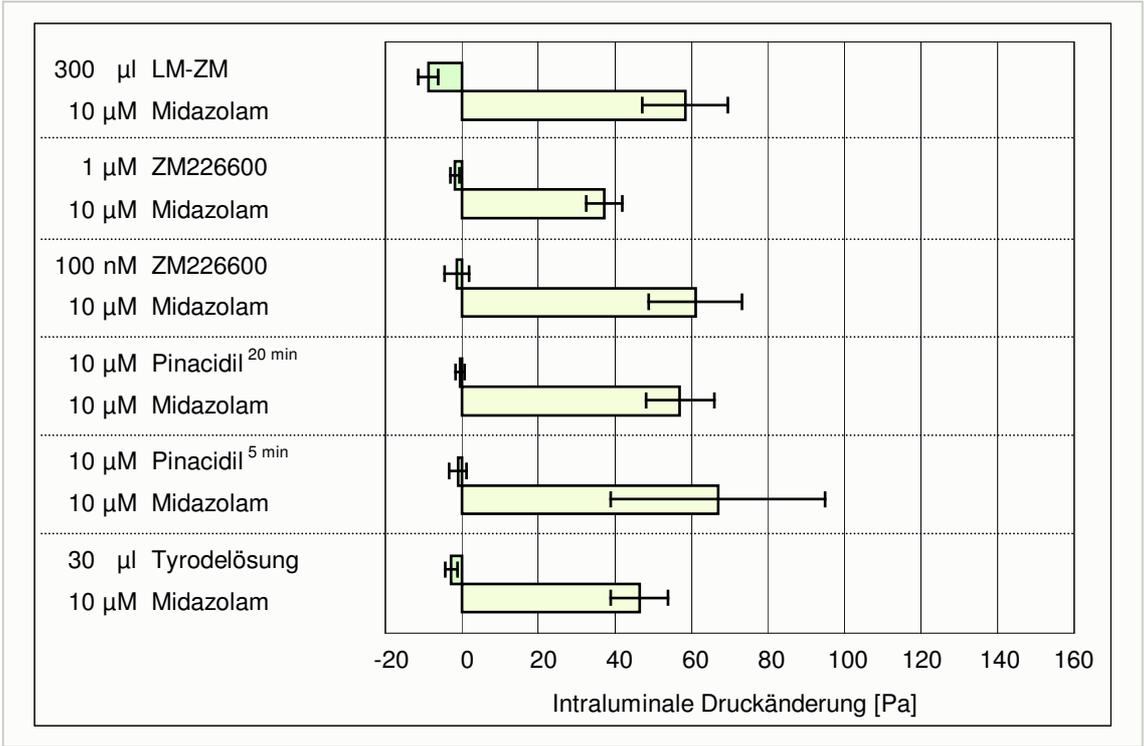


Abb. 24: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach der Erstapplikation und der Zugabe von 10 µM Midazolam bezogen auf den letzten Wert des Schwellendrucks vor der jeweiligen Substanzzugabe.

3.2.3.2 Applikation des Stickstoffmonoxiddonors Natriumnitroprussid

Die Untersuchung, ob Stickstoffmonoxid die inhibitorische Wirkung des Midazolams verstärkt, erfolgte mit dem Stickstoffmonoxid-donor NaNP. Beide Substanzen wurden in Badkonzentrationen von 10 und 100 μM getestet (Tab. 18).

Tab. 18: Tabellarische Darstellung der Versuchsdurchführungen

1. Applikation		Zeit [min]	2. Applikation		Zeit [min]
Midazolam	10 μM	20	Tyrodelösung	30 μl	60
Midazolam	10 μM	20	NaNP	10 μM	60
Midazolam	100 μM	20	NaNP	10 μM	60
Midazolam	100 μM	20	NaNP	100 μM	60
Tyrodelösung	30 μl	20	Midazolam	10 μM	60
NaNP	10 μM	20	Midazolam	10 μM	60

Nach 20-minütiger Vorbehandlung der Dünndarmsegmente mit 10 μM Midazolam induzierte die Applikation von 10 μM NaNP im Vergleich zur Tyrodelösung eine signifikante Erhöhung des Schwellendruckniveaus (Abb. 25, 26, 29; Tab. 19).

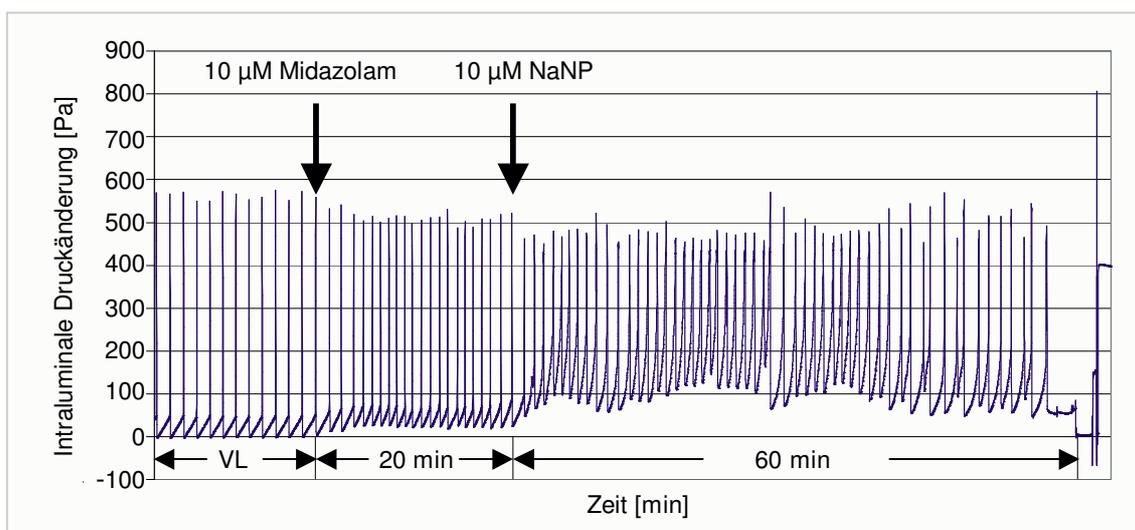


Abb. 25: Originalregistrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 μM NaNP bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 10 μM Midazolam

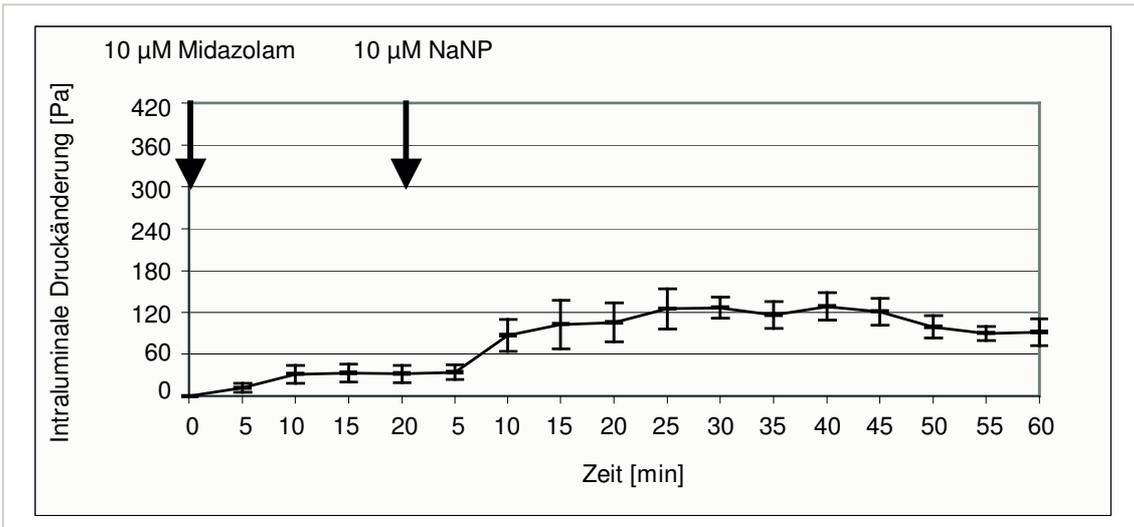


Abb. 26: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM NaNP bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 10 µM Midazolam

In 1 von 7 Darmsegmenten (14,3%) induzierte die Applikation von 10 µM NaNP nach 4,3 Minuten eine komplette Hemmung der Peristaltik, die nach 10,0 Minuten spontane Aktivität zeigt und 13,6 Minuten nach kompletter Hemmung in eine regelhafte Peristaltik übergeht.

Die 20-minütige Vorbehandlung der Darmsegmente mit 10 µM NaNP führte zu einer signifikanten Verstärkung der inhibitorischen Wirkung des 10 µM Midazolams. Der Schwellendruckanstieg nach Midazolamapplikation war bei 20-minütiger Vorbehandlung mit NaNP ausgeprägter als in der Tyrodekontrollgruppe (Abb. 27, 28, 29; Tab. 19). Die Zugabe von 10 µM Midazolam induzierte in 4 von 10 Versuchsdurchführungen (40%) nach $12 \pm 4,1$ Minuten eine komplette Hemmung der intestinalen Peristaltik. In 3 der 4 (75%) komplett gehemmten Darmsegmente kam es nach $4,8 \pm 3,6$ Minuten zu spontaner Aktivität. Bei keinem der Darmsegmente, deren intestinale Motilität komplett gehemmt war, kam es zu einer Rückkehr regelhafter Peristaltik (Abb. 27).

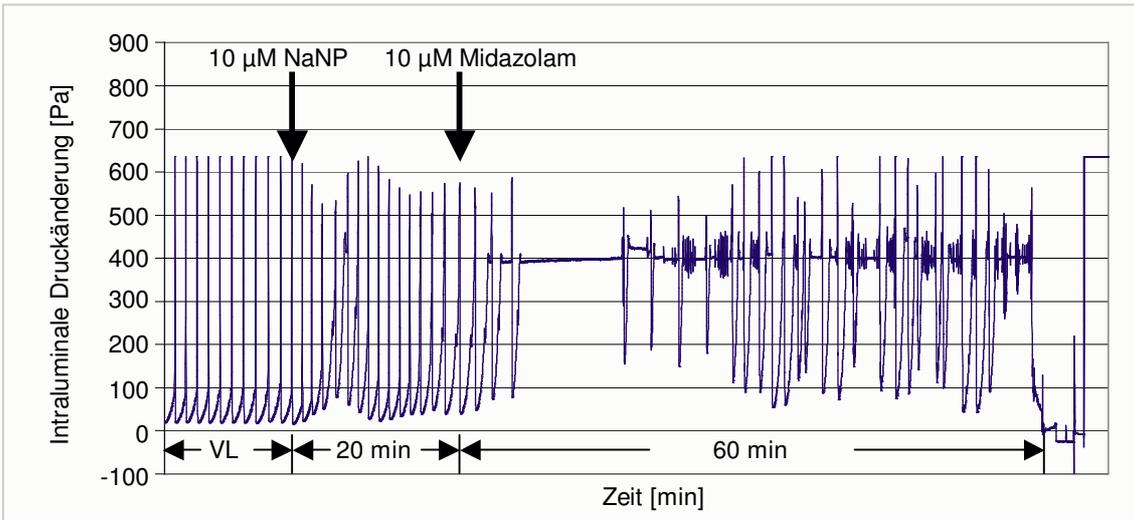


Abb. 27: Originalregistrierung einer kompletten Hemmung induziert durch die Applikation von 10 µM Midazolam nach 20-minütiger Vorbehandlung des Darms mit 10 µM NaNP: Komplette Hemmung der Darmperistaltik mit spontaner Aktivität, jedoch keine Recovery.

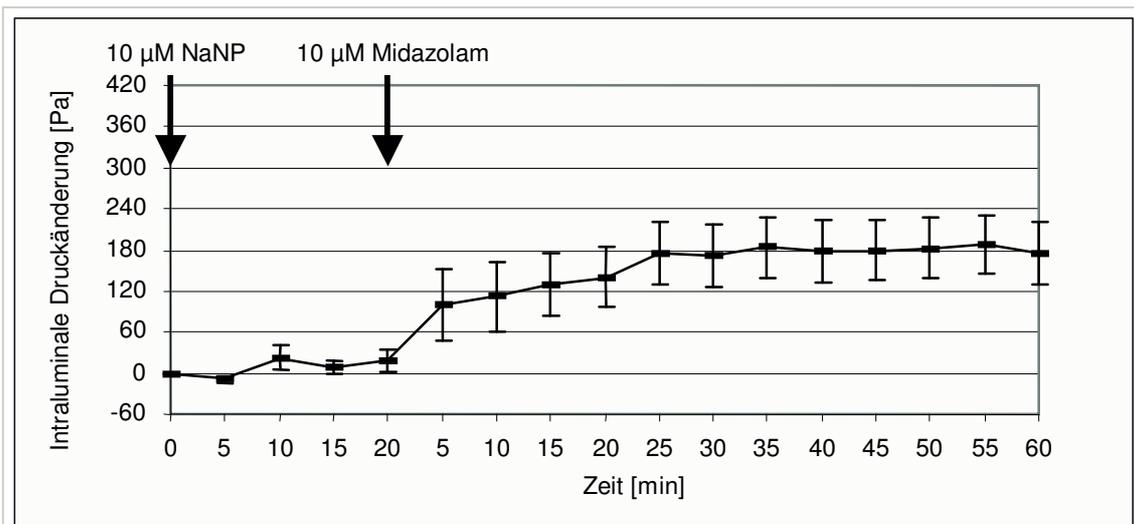


Abb. 28: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 10 µM NaNP

In beiden Versuchsgruppen induzierte die Kombination von NaNP und Midazolam eine im Vergleich zur jeweiligen Tyrodekontrollgruppe signifikante Erhöhung des Schwellendrucks (Abb. 25-29; Tab. 19).

Tab. 19: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Schwellendruckänderung mit den dazugehörigen SEM nach Applikation 1 und Applikation 2.

1. Applikation		ΔP	SEM	2. Applikation		ΔP	SEM
		[Pa]	[Pa]			[Pa]	[Pa]
Midazolam	10 μ M	+ 52,6 \pm 17,9		Tyrodellösung	30 μ l	- 4,1 \pm 2,1	
Midazolam	10 μ M	+ 27,3 \pm 8,7		NaNP	10 μ M	+ 70,2 \pm 20,7	
Tyrodellösung	30 μ l	- 2,7 \pm 1,6		Midazolam	10 μ M	+ 46,4 \pm 7,5	
NaNP	10 μ M	+ 10,2 \pm 8,8		Midazolam	10 μ M	+ 140,9 \pm 32,3	

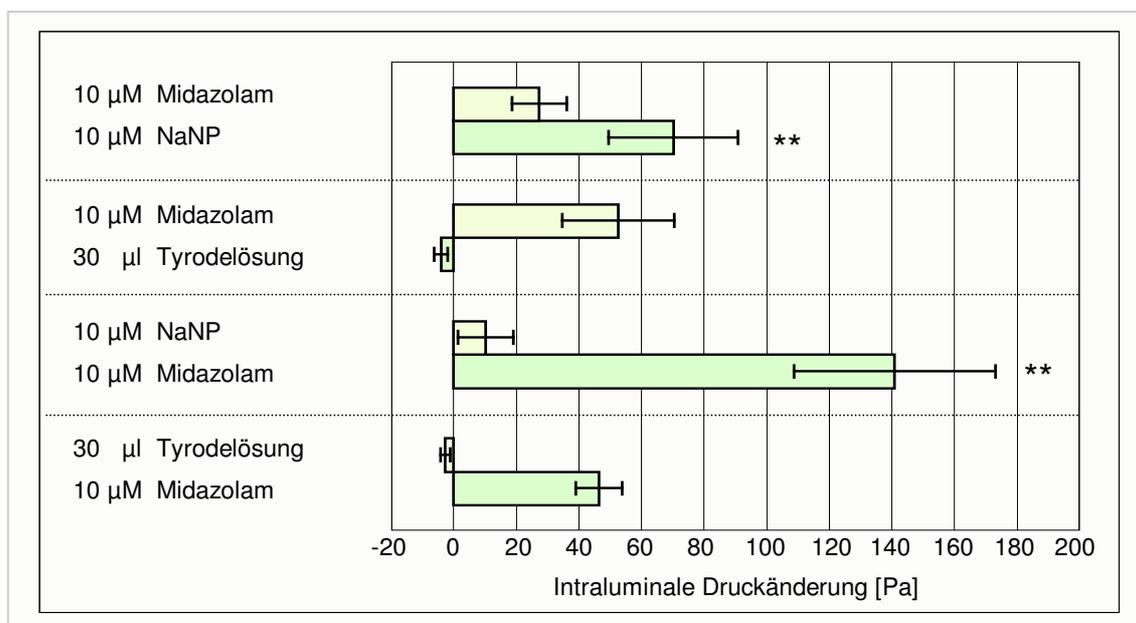


Abb. 29: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach der Erstapplikation und Zweitapplikation bezogen auf den letzten Wert des Schwellendrucks vor der jeweiligen Substanzzugabe. ** steht für ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

Die Applikation von 100 μ M Midazolam induzierte bei allen Darmsegmenten eine komplette Hemmung der Peristaltik. Die Zugabe von 10 μ M NaNP bzw. 100 μ M NaNP zu den komplett gehemmten Dünndarmsegmenten führten im Vergleich zur Tyrodellösung zu keiner Änderung des Schwellendruckniveaus bzw. Modifikation der peristaltischen Aktivität.

4 DISKUSSION

4.1 Ziel der Untersuchung

Ziel dieser Arbeit war es, erste orientierende Ergebnisse bezüglich der Wirkung des Benzodiazepins Midazolam auf die Dünndarmperistaltik in vitro zu ermitteln.

4.2 Beurteilung des Versuchaufbaus, der Versuchsdurchführung und der Auswertungsparameter

An isolierten Dünndarmsegmenten des Meerschweinchens kann durch Perfusion des intestinalen Lumens peristaltische Aktivität in vitro induziert werden (Trendelenburg, 1917). Die hierzu durchgeführte Untersuchung erfolgte mit einem nach Costall et al. (1993), Holzer und Maggi (1994) schon vorher im Detail beschriebenen Perfusionssystem. Die Beeinflussung der peristaltischen Aktivität durch die applizierten Substanzen wurde anhand des Schwellendrucks registriert und ausgewertet. Die Druckschwelle, welche die Auslösung der peristaltischen Welle induziert, ist ein häufig gebrauchter Parameter zur Beurteilung der Peristaltik (Costall et al., 1993; Waterman und Costa, 1994; Holzer und Maggi, 1994; Barthó und Holzer, 1995; Holzer et al., 1997). Die Frequenz der peristaltischen Aktivität wurde nicht als Parameter herangezogen, da diese am wenigsten sensitiv für Veränderungen der Peristaltik ist (Holzer und Maggi, 1994).

Zur Aufklärung der Mechanismen, über die Midazolam die peristaltische Aktivität beeinflusst, wurden selektive Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren in Kombination mit dem Midazolam appliziert. Dieses Standardverfahren wurde bereits bei einer Vielzahl von Studien eingesetzt (Katsoulis et al., 1993; Waterman und Costa, 1994; Heinemann und Holzer, 1999a; Barthó et al., 2000).

4.3 Wirkung des Midazolams – Beurteilung der Wirkmechanismen

Über die Auswirkungen des Midazolams auf die intestinale Motilität ist bisher wenig bekannt. Untersuchungen von Yamakage et al. (1999), die sich mit den Effekten des Midazolams auf die glatte Muskulatur der Trachea beschäftigten, weisen auf die inhibierende Wirkung des Midazolams hin. In unserer Studie hemmte Midazolam dosisabhängig die Dünndarmperistaltik. Midazolam führte in den Badkonzentrationen 0,1 μM und 1 μM zu keiner wesentlichen Änderung der intestinalen Motilität. In den Konzentrationen 10 μM und 100 μM induzierte es eine signifikante Erhöhung des Schwellendrucks bis zur kompletten Aufhebung der peristaltischen Aktivität.

4.3.1 Wirkung an Kaliumkanälen

Eine Hypothese der vorliegenden Arbeit war, daß Midazolam über eine agonistische Wirkung an Kaliumkanälen zu einer Inhibition der Dünndarmperistaltik führt. Kaliumkanäle spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation von Membranpotentialen und der Erregbarkeit von Zellen. Es wurden mehrere verschiedene Typen von Kaliumkanälen indentifiziert, wobei das Vorkommen, die Charakteristik und die Funktion dieser Kanäle zwischen den verschiedenen Geweben variiert. Die drei wichtigsten Kaliumkanäle der glatten Muskulatur sind ATP-abhängige, kalziumabhängige und spannungsabhängige Kaliumkanäle. ATP-abhängige Kaliumkanäle werden durch ein Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration und einen Anstieg der Nukleotiddiphosphatkonzentration aktiviert. Die Aktivierung kalziumabhängiger Kaliumkanäle erfolgt hingegen durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziums, die der spannungsabhängigen Kaliumkanäle durch eine Depolarisation der Zellmembran (Nielsen-Kudsk, 1996). Die Öffnung von Kaliumkanälen induziert eine Hyperpolarisation der Membran, einen Anstieg des Schwellendrucks und damit eine Inhibition der peristaltischen Aktivität der Dünndarmsegmente (Maggi et al., 1996). Grundgedanken der zur Aufklärung des Wirkmechanismus durchgeführten Experimente waren, daß bei Induktion der Midazolamwirkung über

kalziumabhängige Kaliumkanäle der hemmende Effekt auf die peristaltische Aktivität durch Apamin antagonisiert werden kann. Bei der Vermittlung der Midazolamwirkung über ATP-abhängige Kaliumkanäle wird die inhibitorische Wirkung des 10 μM Midazolams einerseits durch Glibenclamid gehemmt, andererseits durch die Kaliumkanalöffner Pinacidil und ZM226600 gefördert. Der kalziumabhängige Kaliumkanalblocker Apamin gehört neben L-NAME und Naloxon zu den Substanzen, welche die intestinale Peristaltik stimulieren (Heinemann und Holzer, 1999b). Nach Spencer et al. (1999) erhöht das Apamin auf einen Stimulus signifikant die Anzahl der Kontraktionen der longitudinalen und zirkulären Muskulatur nach anal und der longitudinalen Muskulatur nach oral. Apamin steigert die Geschwindigkeit der Propulsion des Gastrointestinaltraktes und erhöht den spontanen Ruhetonus und die phasische Aktivität der zirkulären Muskulatur (Ciccocioppo et al., 1994). Diese Wirkung wird jedoch von anderen Autoren angezweifelt. In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Waterman und Costa (1994) durch die Applikation von Apamin keine signifikante Änderung des Schwellendrucks erreicht werden. 500 nM Apamin führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der inhibitorischen Wirkung des 10 μM Midazolams, die durch 100 μM Midazolam induzierte komplette Hemmung der Dünndarmperistaltik wurde jedoch nicht beeinflusst. Die Applikation des ATP-abhängigen Kaliumkanalblockers Glibenclamid in einer 100 nM bzw. 1 μM Badkonzentration konnte die inhibitorische Wirkung des Midazolams nicht antagonisieren. Wie auch in den Untersuchungen von Kontani et al. (1993) hatte Glibenclamid keine signifikante Eigenwirkung auf die intestinale Motilität. In der Literatur findet sich bisher noch keine Studie hinsichtlich der Antagonisierung der Midazolamwirkung durch Glibenclamid. Pinacidil und ZM226600 entfalten ihre Wirkung über das Öffnen von ATP-abhängigen Kaliumkanälen. Dies führt zu einem Kaliumausstrom, verbunden mit einer Hyperpolarisation der Zellmembran, und somit zu einer verminderten Erregbarkeit der Zelle mit einer Relaxation der glatten Muskulatur (Nielsen-Kudsk, 1996). Vergleichbare Angaben hinsichtlich der inhibitorischen Effekte von Agonisten an Kaliumkanälen finden sich in Arbeiten an isolierten

Harnleitersegmenten (Kontani et al., 1993; Maggi et al., 1996). Die Ergebnisse aus der Literatur ließen sich in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigen. Weder 10 μM Pinacidil, appliziert mit unterschiedlichen Wirkzeiten vor Midazolamapplikation, noch 100 nM bzw. 1 μM ZM226600 hatten eine signifikante Eigenwirkung auf die peristaltische Aktivität. Dies könnte sich dadurch erklären lassen, daß bezüglich des Aufbaus der ATP-abhängigen Kaliumkanäle verschiedener Gewebe Unterschiede bestehen (Nielsen-Kudsk, 1996). Die Vorbehandlung der Darmsegmente mit Pinacidil bzw. ZM226600 führte zu keiner Verstärkung der inhibitorischen Wirkung des 10 μM Midazolams. Der Versuch der Induktion einer kompletten Hemmung nach Applikation von 10 μM Midazolam gelang nicht.

Die vorgestellten Ergebnisse erlauben die Aussage, daß Midazolam u.a. durch Öffnen kalziumabhängiger Kaliumkanäle wirkt. Eine Aktivierung ATP-abhängiger Kaliumkanäle liegt nicht vor.

4.3.2 Wirkung an Kalziumkanälen, über Freisetzung von intrazellulärem Kalzium bzw. Veränderung der Kalziumsensitivität

In der Literatur finden sich vielfältige Studienansätze über die Wirkung von Midazolam auf die glatte Muskulatur des Oesophagus und der Trachea. Midazolam induziert eine dosisabhängige Inhibition spannungsabhängiger Kalziumkanäle und kalziumaktivierter, spannungsabhängiger Kaliumkanäle. Dies führt zu einer Relaxation der Trachealmuskulatur (Yamakage et al., 1999). Yoshimura et al. (1995) zeigte zudem, daß Midazolam nur durch Inhibition der Kalziumkanäle eine direkte Relaxation der Trachealmuskulatur bewirkt, nicht jedoch über Freisetzung des intrazellulär gespeicherten Kalziums bzw. Veränderung der Kalziumsensitivität des kontraktile Apparates. Auch Hanazaki et al. (2000) konnten eine direkte Hemmung des Midazolams in einer 100 μM Badkonzentration auf die glatte Muskulatur der Atemwege ohne Beeinflussung der Kalziumsensitivität nachweisen. Für eine Inhibition des Kalziumeinstroms nicht nur über spannungsabhängige Kalziumkanäle, sondern auch über Agonisten-vermittelte Kalziumströme und eine Hemmung der Freisetzung

intrazellulärer Kalziumspeicher sprechen Untersuchungen von Yamaguchi et al. (1997). Midazolam wirkt nicht über neurale Signalwege, periphere oder zentrale Benzodiazepinrezeptoren, sondern direkt an der glatten Muskulatur (Koga et al., 1992).

Die in den bereits genannten Studien beschriebene Wirkung über Kalziumkanäle, die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium bzw. die Veränderung der Kalziumsensitivität des kontraktile Apparates wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Wir greifen hier auf die Erkenntnisse der im Vorfeld durchgeführten Untersuchungen zurück.

4.3.3 Wirkung über den zentralen Benzodiazepinrezeptor

In der vorliegenden Arbeit führte 1 μ M Flumazenil zu keiner Änderung des Schwellendruckniveaus. Hinsichtlich der Eigenwirkung des Flumazenils auf die Peristaltik ist bisher nur wenig bekannt. Die intrinsische bzw. agonistische Wirkung des Flumazenils an Benzodiazepinbindungsstellen im ZNS ist gering (Larsen, 1998). In Einklang mit den Ergebnissen unserer Studie kann die inhibitorische Wirkung des Midazolams auf die intestinale Motilität durch Flumazenil, einem Antagonisten an zentralen Benzodiazepinrezeptoren, nicht aufgehoben werden (Yamakage et al., 1999; Yoshimura et al., 1995). Auch Untersuchungen von Koga et al. (1992) an der glatten Muskulatur der Trachea weisen darauf hin, daß die inhibitorische Wirkung des Midazolams nicht über den zentralen Benzodiazepinrezeptor vermittelt wird.

4.3.4 Wirkung an GABA_A-Bindungsstellen

Die inhibitorischen und stimulierenden Effekte der GABA sind durch die Wirkung zweier Subtypen der GABA-Bindungsstelle zu erklären. Die Stimulation der GABA_A-Bindungsstelle induziert eine peripher vermittelte Inhibition der intestinalen Motilität. Bicuculline blockt die Wirkung über die GABA_A-Bindungsstelle und induziert somit eine Stimulation der Peristaltik. Im

Gegensatz dazu führt eine Stimulation der GABA_B-Bindungsstelle zu einem Anstieg der intestinalen Motilität (Fargeas et al., 1988).

Versuche an innervierten Muskelstreifen zeigen, daß die durch GABA induzierte Relaxation durch Applikation des GABA_A-Rezeptor-Blockers Bicuculline antagonisiert werden kann. Die Blockade der GABA_A-Bindungsstelle durch Bicuculline führt zu einer Hemmung der über VIP-Motoneurone vermittelten aboralen Relaxation und über cholinerge Motoneurone induzierten oralen Kontraktion des Peristaltikreflexes. Die durch VIP induzierte Relaxation maskiert die kontraktile Wirkung des Acetylcholins (Grider und Makhlof, 1992). Ein möglicher Wirkmechanismus des Midazolams wäre die Induktion inhibitorischer Effekte durch die GABA_A-Bindungsstelle.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß 10 µM Bicuculline als Antagonist an GABA_A-Bindungsstellen keine signifikante Eigenwirkung auf die peristaltische Aktivität hat. Dies widerspricht den Ergebnissen von Schwörer und Kilbinger (1988). In deren Arbeit wirkt das Bicuculline über die GABA_A-Bindungsstelle in den Badkonzentrationen 1 µM und 10 µM stimulierend auf die intestinale Motilität. Tonini et al. (1989) konnten bis zu einer Badkonzentrationen von 3 µM Bicuculline keine Beeinflussung der Peristaltik nachweisen. Badkonzentrationen von 10 µM und 30 µM Bicuculline induzierten jedoch eine dosisabhängige Stimulation der peristaltischen Aktivität. In einer vergleichenden Studie zwischen den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicuculline und SR 95531 fand die Arbeitsgruppe um Tonini (1989) heraus, daß Bicuculline die peristaltische Aktivität des Ileums vermutlich via Verbesserung der cholinergen Transmission verstärkt, die unabhängig von der GABA_A-Rezeptor-Blockade ist.

Bicuculline konnte in einer Badkonzentration von 10 µM den Anstieg des Schwellendruckniveaus nach Zugabe von 10 µM Midazolam nicht reduzieren. In der Literatur findet sich bisher keine Studie, die sich mit der Antagonisierung der Midazolamwirkung an der GABA_A-Bindungsstelle beschäftigt.

4.3.5 Wirkung über Inhibition der Adenylatcyclase

Pituitary adenylylating peptide (PACAP) ist ein hypothalamisches Peptid, das in Neuronen weit verbreitet ist, einschließlich denen des gastrointestinalen Traktes. PACAP-Fasern wurden im myenterischen und submucösen Plexus, in der longitudinalen und zirkulären Muskelschicht, und um Blutgefäße der Submucosa des gesamten Darms gefunden. Es besitzt eine große sequenzielle Übereinstimmung mit dem Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) (Portbury et al., 1995).

PACAP stimuliert die normale Peristaltik und kompensiert medikamenten-induzierte Hemmung durch Stimulation exzitatorisch-motorischer Signalwege, vermutlich auf der Ebene intrinsisch-sensorischer Neurone. Die Wirkung des PACAPs scheint vielfältige Signalmechanismen zu umfassen, einschließlich der Stimulation der Adenylatcyclase (Heinemann und Holzer, 1999a). Diese bewirkt eine Zunahme des cAMP, welches AMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert. Die daraus folgende Phosphorylierung mehrerer Proteine führen zu einem verstärkten Kalziumioneneinstrom und bewirkt somit eine erhöhte Ausschüttung des Transmitters an der axosomatischen Synapse (Schmidt und Thews, 1995). Eine hypothetische Erklärung für die inhibitorische Wirkung des Midazolams könnte die Hemmung der Adenylatcyclase sein.

In Übereinstimmung mit der Literatur (Katsoulis et al., 1993; Grider et al., 1994; Heinemann und Holzer, 1999a; Barthó et al., 2000) konnten wir in unseren Untersuchungen zeigen, daß 3 nM PACAP eine signifikante Eigenwirkung hat. Die stimulierende Wirkung des PACAP und des VIP auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur des Dünndarms kann durch Applikation von PACAP-(6-38), einem Antagonisten an PACAP-Bindungsstellen, antagonisiert werden (Barthó et al., 2000). PACAP fördert die Phase der aboralen Relaxation des Peristaltikreflexes und führt somit zu einer Stimulation der propulsiven Darmmotilität (Grider et al., 1994). Untersuchungen an isolierten Dünndarmsegmenten des Meerschweinchens weisen darauf hin, daß die PACAP-induzierten Kontraktionen der Darmsegmente über eine Freisetzung von Acetylcholin und Substanz P durch Interaktion mit PACAP-1 und

VIP/PACAP-2-Rezeptoren vermittelt werden (Katsoulis et al., 1993). Trotz der signifikanten Eigenwirkung des 3 nM PACAP blieb die hemmende Wirkung des 10 μ M Midazolams auf die Dünndarmperistaltik unbeeinflusst.

4.3.6 Wirkung über endogene opioiderge Mechanismen

Ergebnisse von In-vitro-Untersuchungen und klinischen Studien weisen auf die inhibitorische Wirkung von Opioiden auf die gastrointestinale Motilität hin (Adams und Pohlemann, 1999; Freye und Knuefermann, 1994; Roger et al., 1994). Diese hemmenden Effekte können durch die Vorbehandlung mit Naloxon aufgehoben werden (Ruckebusch et al., 1984). Untersuchungen an isolierten Dünndarmsegmenten zeigen, daß bei Blockade von opioidergen Rezeptoren durch Naloxon die peristaltische Aktivität gesteigert wird (Kromer et al., 1981; Kromer, 1990). Wie in der Literatur beschrieben hatte 500 nM Naloxon auch in der vorliegenden Arbeit eine signifikant stimulierende Eigenwirkung auf die Dünndarmperistaltik. Naloxon gehört zu den Substanzen, welche die peristaltische Aktivität fördern (Heinemann und Holzer, 1999b) und dosisabhängig die durch Acetylcholin induzierte rhythmische Peristaltik begünstigen (Kromer et al., 1982). Untersuchungen von Grider und Makhoulouf (1987) an Kolonsegmenten von Ratten erlaubten die Charakterisierung der einzelnen Komponenten des Peristaltikreflexes. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Naloxon zu einer Abschwächung der oralen Kontraktion und Verstärkung der aboralen Relaxation führt.

Die Hypothese, daß Midazolam über endogene opioiderge Mechanismen inhibitorisch auf die glatte Muskulatur des Dünndarms wirkt, läßt sich durch unsere Ergebnisse belegen. Die Vorbehandlung der Dünndarmsegmente mit 500 nM Naloxon führte zu einem reduzierten Schwellendruckanstieg nach der Applikation des 10 μ M Midazolams. Die Vorbehandlung mit 500 nM Naloxon bei anschließender Applikation von 100 μ M Midazolam führte nach kompletter Hemmung der peristaltischen Aktivität zu unkoordinierten, segmentalen Wandbewegungen bis hin zu Spontanaktivitäten. Zu einer Rückkehr geordneter peristaltischer Aktivität kam es nicht.

4.3.7 Wirkung über Freisetzung von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid spielt eine bedeutende Rolle in der Physiologie des Gastrointestinaltraktes und dessen Reaktion auf septische Krankheitsbilder. Eine Freisetzung von NO erfolgt u.a. aus dem intrinsisch-intestinalen Gewebe (Mastzellen, Epithelien, glatte Muskulatur, neuraler Plexus), gewebständigen und einwandernden Leukozyten (Neutrophile, Monozyten) und durch Denitrifikation durch Anaerobier. Die Synthese des Stickstoffmonoxids erfolgt durch zwei verschiedene Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthetase. Unter Ruhebedingungen übernimmt die im Gehirn und Endothel vorkommende Form der NOS die NO-Produktion, wohingegen die NO-Freisetzung durch entzündliche Stimuli über die induzierbare NO-Synthetase vermittelt wird (Salzman, 1995). NO wird in den Gefäßendothelien und in den neuralen enterischen Plexus durch die Stickstoffmonoxidsynthetase aus L-Arginin gebildet (Maher et al., 1995). Stickstoffmonoxid ist einer der wichtigsten Neurotransmitter des nichtadrenergen, nichtcholinergen enterischen Nervensystems. Die Koordination der Peristaltik wird u.a. über die endogene Freisetzung von NO gesteuert. Wie schon von Holzer et al. (1997) beschrieben erfolgte auch in der vorliegenden Arbeit die Applikation von exogenem NO durch den Stickstoffmonoxid-donor Natriumnitroprussid (NaNP). Dies führt zu einem signifikanten Anstieg des Schwellendrucks und somit zu einer Inhibition der peristaltischen Aktivität (Waterman und Costa, 1994). Nach Vorbehandlung der Dünndarmsegmente mit 10 μM Midazolam induzierte die Zugabe von 10 μM NaNP in 1 von 7 Darmsegmenten eine komplette Hemmung der peristaltischen Aktivität mit Spontanaktivität und anschließendem Übergang in eine regelhafte Peristaltik. NaNP als erstapplizierte Substanz führte zu einer Verstärkung der inhibitorischen Wirkung des 10 μM Midazolams. Hierbei kam es bei 4 von 10 Dünndarmsegmenten zu einem kompletten Stillstand der Peristaltik. Spontanaktivität konnte verzeichnet werden, zu einer Rückkehr regelhafter peristaltischer Aktivität kam es nicht. Die durch Stickstoffmonoxid bzw. NaNP dosisabhängig induzierte Relaxation der glatten Muskulatur kann durch die Applikation des L-NAME aufgehoben werden (Smits et al., 1996).

Dieser Inhibitor der NO-Synthetase führt zu einer signifikanten Senkung des Schwellendrucks und somit zu einer Stimulation der intestinalen Peristaltik (Barthó und Holzer, 1995; Heinemann und Holzer, 1999b; Holzer et al., 1997; Waterman und Costa, 1994), wohingegen die Applikation des Stereoisomers D-NAME keinen signifikanten Effekt auf die propulsive Darmbewegungen hat (Allescher et al., 1992; Holzer et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigte L-NAME in Gegensatz zur Literatur keine Eigenwirkung, die Effekte des nicht wirksamen Isomers D-NAME konnten hingegen bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür bieten die Untersuchungen von Holzer et al. (1997). Stickstoffmonoxid zeigt sowohl einen exzitatorischen Effekt über cholinerge Motoneurone, als auch eine inhibitorische Wirkung, die sich in einer Relaxation der intestinalen Muskulatur widerspiegelt. Denkbar ist, daß sich diese Effekte aufheben, und somit die Antagonisierung durch L-NAME keine Wirkung zeigt. Eine Antagonisierung der inhibitorischen Wirkung des Midazolams gelang weder durch die Vorbehandlung der Dünndarmsegmente mit L-NAME noch mit D-NAME.

Midazolam und NaNP zeigen eine synergistisch-inhibitorische Wirkung auf die peristaltische Aktivität des Dünndarms. Unsere Arbeit dokumentiert, daß der hemmende Effekt des Midazolams nicht über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid vermittelt wird.

4.3.8 Schlußfolgerung

Aus den verschiedenen Aspekten der Literatur und den Ergebnissen der aktuellen Arbeit folgt, daß Midazolam eine inhibitorische Wirkung auf die Dünndarmperistaltik hat. Die Wirkung des Midazolams wird über mehrere Mechanismen vermittelt.

Im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen weisen darauf hin, daß Midazolam über eine Hemmung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und Agonisten-vermittelter Kalziumströme inhibitorisch auf die glatte Muskulatur wirkt (Koga et al., 1992; Yoshimura et al., 1995; Yamaguchi et al., 1997; Yamakage et al., 1999; Hanazaki et al., 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Midazolam dosisabhängig endogene opioiderge Mechanismen und kalziumabhängige Kaliumkanäle aktiviert und so zu einer Hemmung der Dünndarmperistaltik führt. Eine Induktion der inhibitorischen Effekte des Midazolams durch Wirkung an der zentralen Benzodiazepinbindungsstelle, Agonismus an der GABA_A-Bindungsstelle, Inhibition der Adenylatcyclase, Öffnen von ATP-abhängigen Kaliumkanälen und Freisetzung von Stickstoffmonoxid konnte nicht bestätigt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die In-vitro-Untersuchungen zur Ermittlung des Wirkmechanismus von Midazolam auf die Dünndarmperistaltik erfolgte mit einem von Holzer und Maggi (1994) beschriebenen Perfusionssystem an Dünndarmsegmenten von Meerschweinchen. Die peristaltische Aktivität der isolierten Segmente wurde durch eine kontinuierliche Flüssigkeitszuleitung am oralen Ende induziert. Dies bewirkte eine langsame Füllung des intestinalen Lumens, die bei Erreichen einer bestimmten Druckschwelle eine aboralwärts gerichtete peristaltische Welle induzierte. Dieser intraluminale Schwellendruck wurde zur Beurteilung der Wirkung herangezogen. Eine Stimulation der Peristaltik stellte sich als Senkung, eine Inhibition als Erhöhung des Schwellendrucks dar. Die Applikation der Substanzen erfolgte serosal. Um die Wirkmechanismen des Midazolams zu klären, wurden selektive Agonisten und Antagonisten der vermuteten Mediatoren in Kombination mit Midazolam appliziert.

Midazolam hemmt dosisabhängig die Dünndarmperistaltik. 0,1 μM und 1 μM Midazolam führt zu keiner wesentlichen Änderung der Druckschwelle. In den Konzentrationen 10 μM und 100 μM induzierte es eine signifikante Erhöhung des Schwellendrucks bis zur kompletten Aufhebung peristaltischer Aktivität. Die inhibitorischen Effekte des Midazolams auf die propulsive Motilität ließen sich nur durch Applikation von Antagonisten an opioidergen Rezeptoren und kalziumabhängigen Kaliumkanälen signifikant abschwächen. Signifikante synergistisch-inhibitorische Wirkung zeigte das Midazolam hingegen in Kombination mit Stickstoffmonoxid.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die inhibitorischen Effekte des Benzodiazepins Midazolam auf die Dünndarmperistaltik durch agonistische Wirkung an opioidergen Rezeptoren und kalziumabhängigen Kaliumkanälen vermittelt werden. Die hemmende Wirkung des Midazolams wird nicht über die zentrale Benzodiazepinbindungsstelle, den GABA_A-Rezeptor, Inhibition der Adenylatcyclase, Öffnen von ATP-abhängigen Kaliumkanälen oder Freisetzung von NO induziert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adams HA, Pohlemann T, 1999:

Der Einfluß von Anästhetika auf die Funktion des Magen-Darm-Trakts
ANAESTHESIOLOGIE UND REANIMATION; 24:88-94

Allescher HD, Sattler D, Piller C, Schusdziarra V, Classen M, 1992:

Ascending neural pathways in the rat ileum in vitro – effect of capsaicin
and involvement of nitric oxide
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 217:153-162

Barthó L, Holzer P, 1985:

Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal
motility
NEUROSCIENCE; 16:1–32

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 ARCHIVES OF PHARMACOLOGY; 353:102-109

Barthó L, Lázár Z, Lénárd L Jr, Benkó R, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J,
Maggi CA, 2000:

Evidence for the involvement of ATP, but not of VIP/PACAP
or nitric oxide, in the excitatory effect of capsaicin in the small intestine
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 392:183-188

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A, 1970:

Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the
transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in
the gut
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 40:668–688

Bülbring E, Crema A, Saxby OB, 1958:

A method for recording peristalsis in isolated intestine
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 13:440-443

Ciccocioppo R, Onori L, Messori E, Candura SM, Coccini T, Tonini M, 1994:

Role of nitric oxide-dependent and -independent mechanisms in
peristalsis and accommodation in the rabbit distal colon
JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS;
270:929-937

Costall B, Naylor RJ, Tuladhar BR, 1993:

5-HT₄ receptor mediated facilitation of the emptying phase of the
peristaltic reflex in the guinea-pig isolated ileum
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 110:1572-1578

Davanger S, Otterson OP, Storm-Mathisen J, 1987:

Immunocytochemical localization of GABA in cat myenteric plexus
NEUROSCIENCE LETTERS; 73:27-32

Dudziak R, 1985: LEHRBUCH DER ANÄSTHESIOLOGIE, Schattauer Stuttgart – New
York, 3. Auflage; 309

Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L, 1988:

Central and peripheral action of GABA_A and GABA_B agonists on small
intestine motility in rats
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 150:163-169

Freye E, Knüfermann V, 1994:

Keine Hemmung der intestinalen Motilität nach Ketamin-/Midazolam-
narkose. Ein Vergleich zur Narkose mit Enfluran und Fentanyl/
Midazolam
ANAESTHESIST; 43:87-91

Furness JB, Costa M, 1987:

THE NERVOUS SYSTEM. Churchill Livingstone, London

Goyal RK, Rattan S, Said SI, 1980:

VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurones

NATURE; 288:378-380

Grider JR, Katsoulis S, Schmidt WE, Jin JG, 1994:

Regulation of the descending relaxation phase of intestinal peristalsis by PACAP

JOURNAL OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM; 50:151-159

Grider JR, Makhlouf GM, 1987:

Role of opioid neurons in the regulation of intestinal peristalsis

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 253:226-231

Grider JR, Makhlouf GM, 1992:

Enteric GABA: mode of action and role in the regulation of the peristaltic reflex

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY; 262:690-694

Hanazaki M, Jones KA, Warner DO, 2000:

Effects of intravenous anesthetics on Ca²⁺-sensitivity in canine tracheal smooth muscle

ANESTHESIOLOGY; 92:133-139

Harty RF, Franklin PA, 1983:

GABA affects the release of gastrin and somatostatin from rat antral mucosa

NATURE; 303:623-624

Heinemann A, Holzer P, 1999a:

Stimulant action of pituitary adenylate cyclase-activating peptide on normal and drug-compromised peristalsis in the guinea-pig intestine
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 127:763-771

Heinemann A, Holzer P, 1999b:

Intestinal motor depression by 7-nitroindazole through an action unrelated to nitric oxide synthase inhibition
PHARMACOLOGY; 59:310-320

Holzer P, Lippe IT, Tabrizi AL, Lénárd L Jr, Barthó L, 1997:

Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine
JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS;
280:154-161

Holzer P, Maggi CA, 1994:

Synergistic role of muscarinic acetylcholine and tachykinin NK-2 receptors in intestinal peristalsis
NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY; 349:194-201

Holzer P, Schluet W, Maggi CA, 1995:

Substance P stimulates and inhibits intestinal peristalsis via distinct receptors
JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS;
274:322-328

Jessen KR, Mirsky R, Dennison ME, Burnstock G, 1979:

GABA may be a neurotransmitter in the vertebrate peripheral nervous system
NATURE; 281:71-74

Katsoulis S, Clemens A, Schwörer H, Creutzfeldt W, Schmidt WE, 1993:
PACAP is a stimulator of neurogenic contraction in guinea pig ileum
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY; 265:295-302

Koga Y, Sato S, Sodeyama N, Takahashi M, Kato M, Iwatsuki N, Hashimoto Y,
1992: Comparison of the relaxant effects of diazepam, flunitrazepam
and midazolam on airway smooth muscle
BRITISH JOURNAL OF ANAESTHESIA; 69:65-69

Kontani H, Ginkawa M, Sakai T, 1993:
A simple method for measurement of ureteric peristaltic function in vivo
and the effects of drugs acting on ion channels applied from the ureter
lumen in anesthetized rats
JAPANESE JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 62:331-338

Kottegoda SR, 1970:
Peristalsis of the small intestine. In: Bülbbring E, Brading AF, Jones AW,
Tomita T (eds) SMOOTH MUSCLE. Edward Arnold; London; 525-541

Kromer W, 1990:
Reflex peristalsis in the guinea pig isolated ileum is endogenously
controlled by kappa opioid receptors
NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY; 341:450-454

Kromer W, Pretzlaff W, Woinoff R, 1981:
Regional distribution of an opioid mechanism in the guinea-pig isolated
intestine. JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY; 33:98-101

Kromer W, Schmidt H, 1982:
Opioids modulate intestinal peristalsis at a site of action additional to
that modulating acetylcholine release. JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND
EXPERIMENTAL THERAPEUTICS; 223:271-274

Langley JN, 1921: THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM. Heffer & Sons

Larsen R, 1998: ANÄSTHESIE. Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore; 6. überarbeitete Auflage: 78-79, 82, 106

Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A, 1993:
Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists
JOURNAL OF AUTONOMIC PHARMACOLOGY; 13:23-93

Maggi CA, Santicoli P, Giuliani S, 1996:
Effect of exercise and 2-deoxyglucose on the K⁺-channel opener action of CGRP in the guinea pig ureter. GENERAL PHARMACOLOGY; 27:95-100

Maher MM, Gontarek JD, Jimenez RE, Cahill PA, Yeo CJ, 1995:
Endogenous nitric oxide promotes ileal absorption
JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH; 58:687-692

Nielsen-Kudsk JE, 1996:
Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries
DANISH MEDICAL BULLETIN; 43:429-447

Portbury AL, McConalogue K, Furness JB, Young HM, 1995:
Distribution of pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) immunoreactivity in neurons of the guinea-pig digestive tract and their projections in the ileum and colon
CELL AND TISSUE RESEARCH; 279:385-392

Rand MJ, 1992:
Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY; 19:147-169

Roger T, Bardon T, Ruckebusch Y, 1994:

Comparative effects of mu and kappa opiate agonists on the cecocolic motility in the pony

CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH; 58:163-166

Ruckebusch Y, Ferré JP, Du C, 1984:

In vivo modulation of intestinal motility and sites of opioid effects in the rat

REGULATORY PEPTIDES; 9:109-117

Salzman AL, 1995: Nitric oxide in the gut. NEW HORIZONS; 3:352-364;

Sanders KM, Ward SM, 1992:

Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY; 262:379–392

Schmidt RF, Thews G, 1995:

PHYSIOLOGIE DES MENSCHEN; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 26. vollständig überarbeitete Auflage: 164

Schwörer H, Katsoulis S, Creutzfeldt W, Schmidt WE, 1992:

Pituitary adenylate cyclase activating peptide, a novel VIP-like gut-brain peptide, relaxes the guinea-pig taenia caeci via apamin-sensitive potassium channels

NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY; 346:511–514

Schwörer H, Kilbinger H, 1988:

Enhancement of guinea-pig intestinal peristalsis by blockade of muscarinic M1-receptors

BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 93:715-720

Smits GJ, Lefebvre RA, 1996:

ATP and nitric oxide: inhibitory NANC neurotransmitters in the longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the rat ileum
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 118:695-703

Spencer N, Walsh M, Smith TK, 1999:

Does the guinea-pig ileum obey the 'law of intestine'?
JOURNAL OF PHYSIOLOGY; 517:889-898

Tonini M, De Petris G, Onori L, Manzo L, Rizzi CA, Crema A, 1989:

The role of GABA_A receptor function in peristaltic activity of the guinea-pig ileum: a comparative study with bicuculline, SR 95531 and picrotoxinin. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY; 97:556-562

Trendelenburg P, 1917:

Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik
ARCHIV FÜR EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE;
81:55-129

Waterman SA, Costa M, 1994:

The role of enteric inhibitory motoneurons in peristalsis in the isolated guinea-pig small intestine
JOURNAL OF PHYSIOLOGY; 477:459-468

Wood JD, 1987:

Physiology of the enteric nervous system
In: Johnson, L.R. (ed.): PHYSIOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT, Raven Press; 2nd ed.: 67-109.

Yamaguchi S, Kanmura Y, Yoshimura N, 1997:

Effects of midazolam on contractions in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery

ANESTHESIA AND ANALGESIA; 84:199-205

Yamakage M, Matsuzaki T, Tsujiguchi N, Honma Y, Namiki A, 1999:

Inhibitory effects of diazepam and midazolam on Ca^{2+} and K^+ channels in canine tracheal smooth muscle cells

ANESTHESIOLOGY; 90:197-207

Yoshimura H, Kai T, Nishimura J, Kobayashi S, Takahashi S, Kanaide H, 1995:

Effects of midazolam on intracellular Ca^{2+} and tension in airway smooth muscles

ANESTHESIOLOGY; 83:1009-1020

Zielmann S, Grote R, 1995:

Auswirkungen der Langzeitsedierung auf die intestinale Funktion

ANAESTHESIST; 44:549-558

7 GRAPHISCHER ANHANG

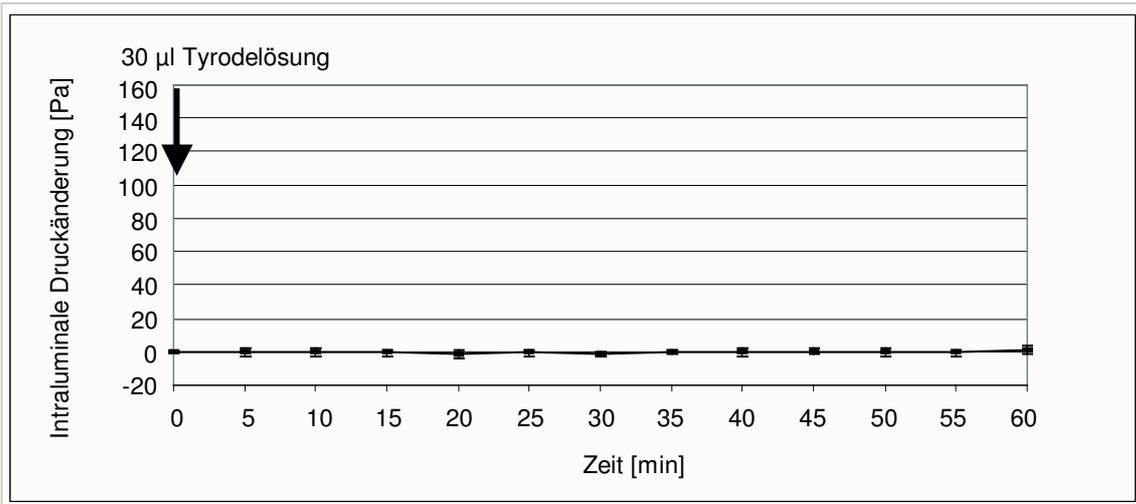


Abb. 30: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 30 µl Tyrodelösung

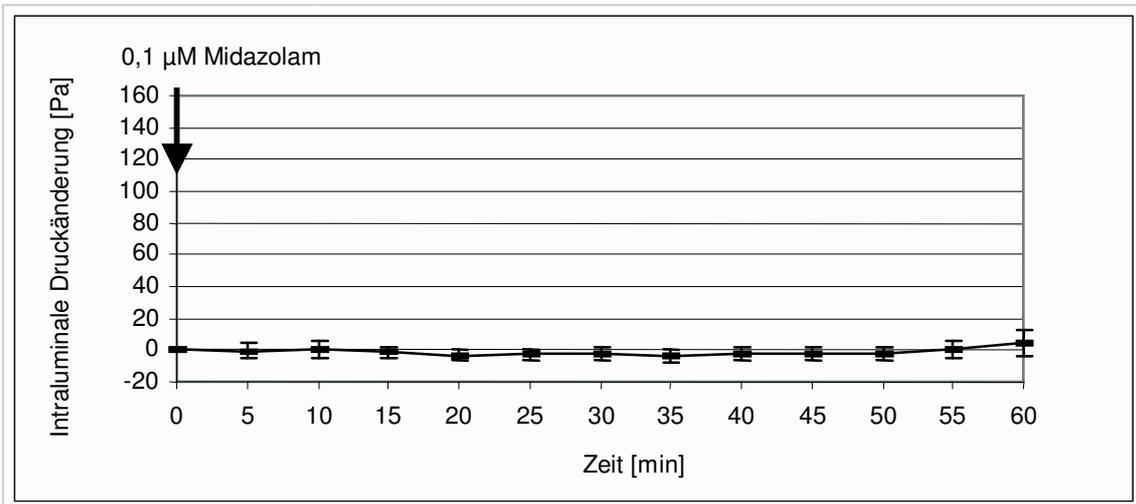


Abb. 31: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 0,1 µM Midazolam

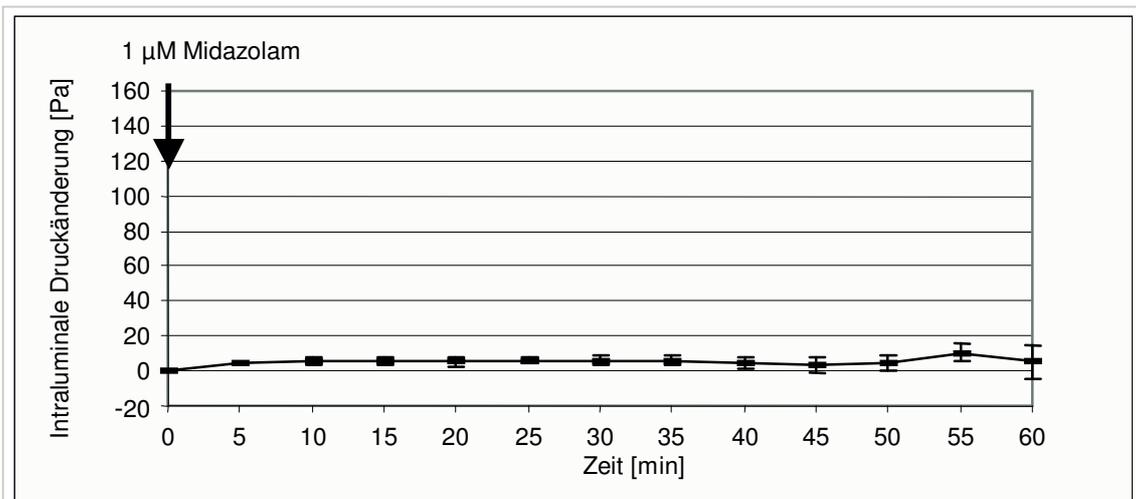


Abb. 32: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 1 µM Midazolam

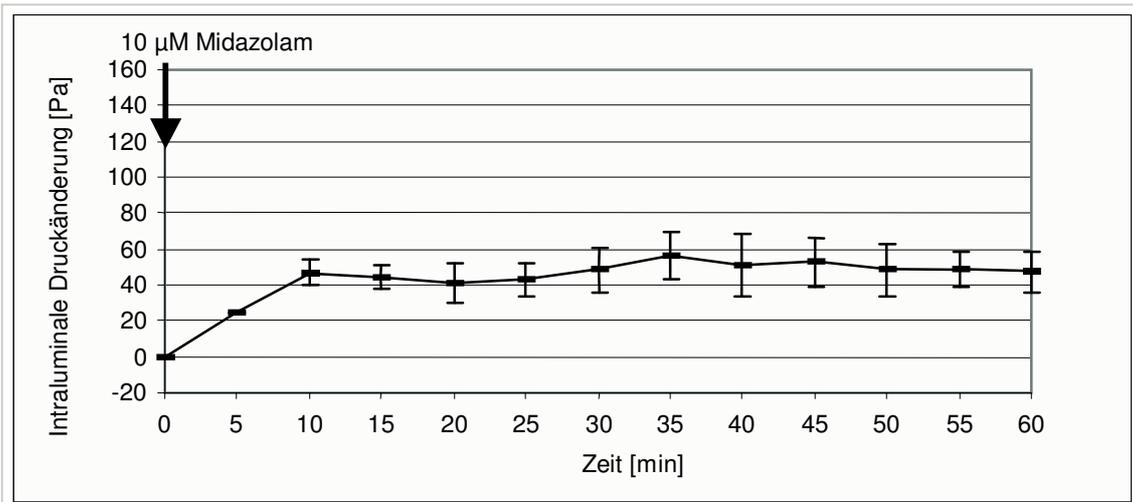


Abb. 33: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam

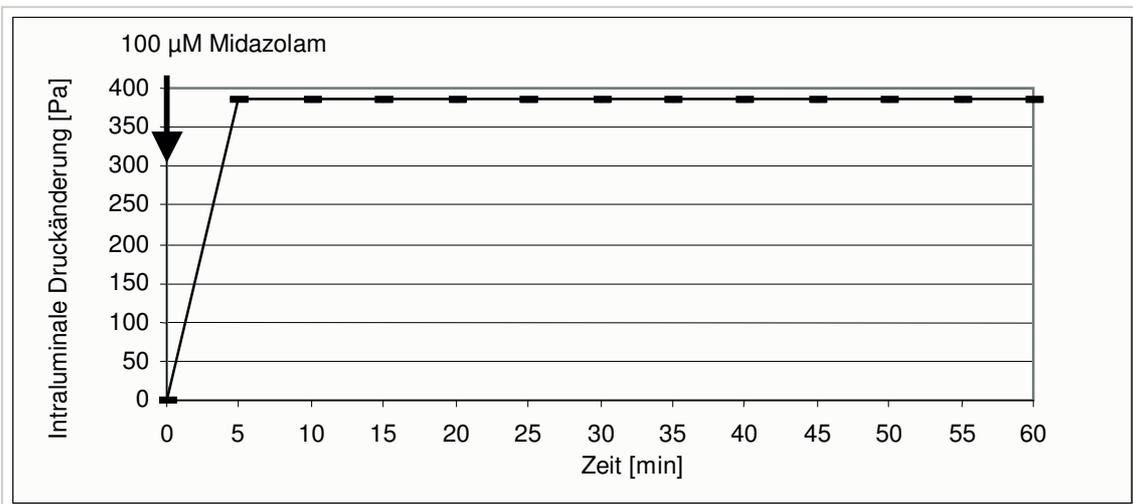


Abb. 34: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 100 µM Midazolam

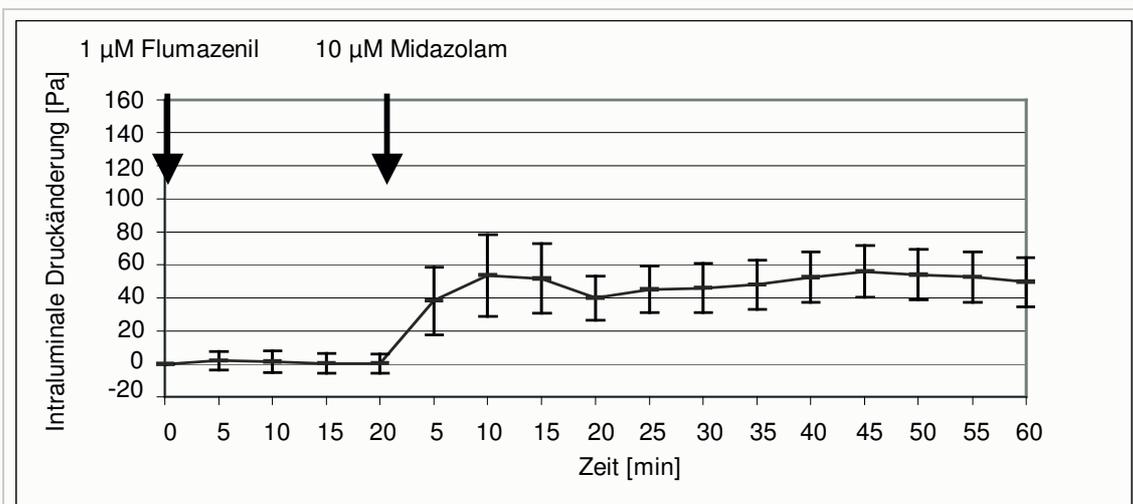


Abb. 35: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 1 µM Flumazenil

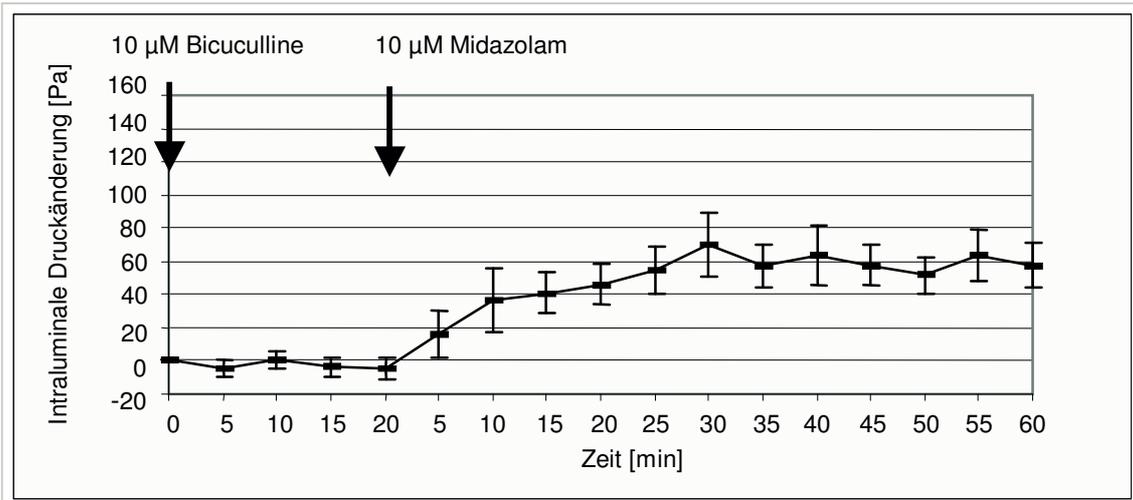


Abb. 36: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 10 µM Bicuculline

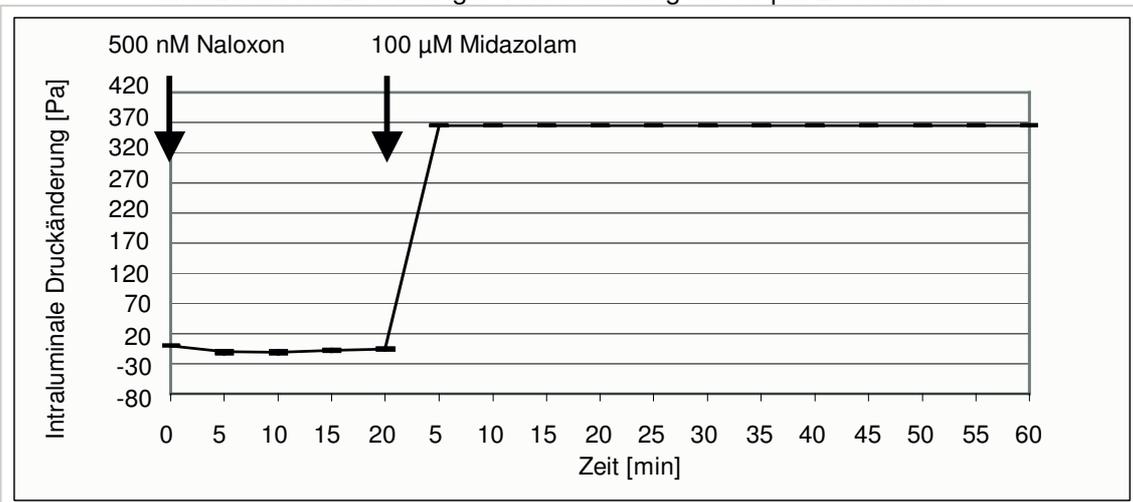


Abb. 37: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 100 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 500 nM Naloxon

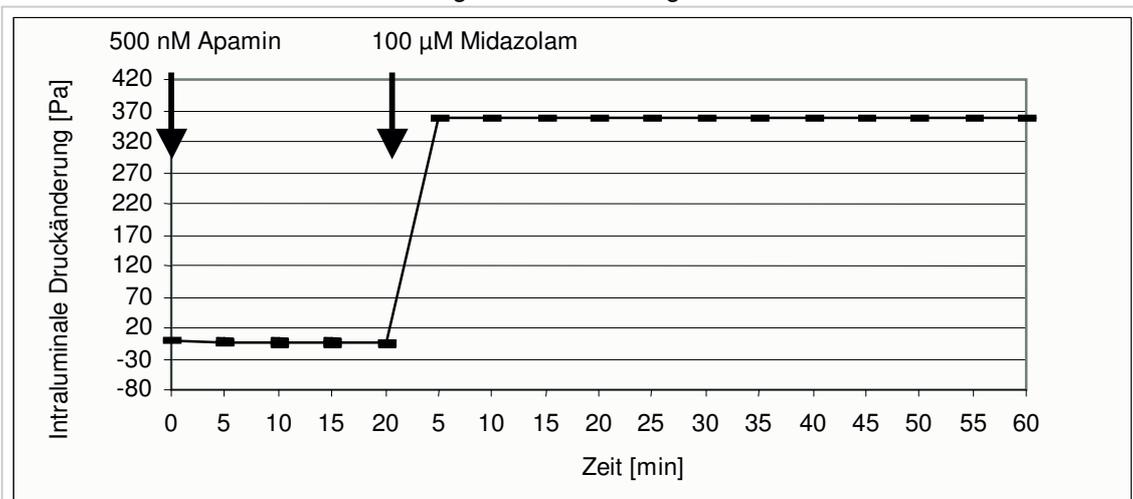


Abb. 38: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 100 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 500 nM Apamin

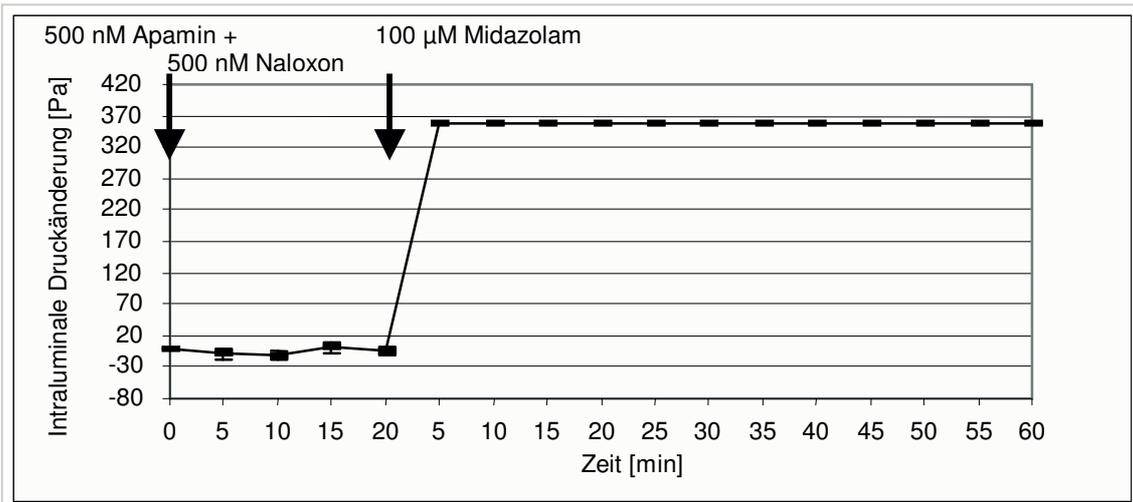


Abb. 39: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 100 µM Midazolam bei Vorbehandlung mit 500 nM Apamin + 500 nM Naloxon

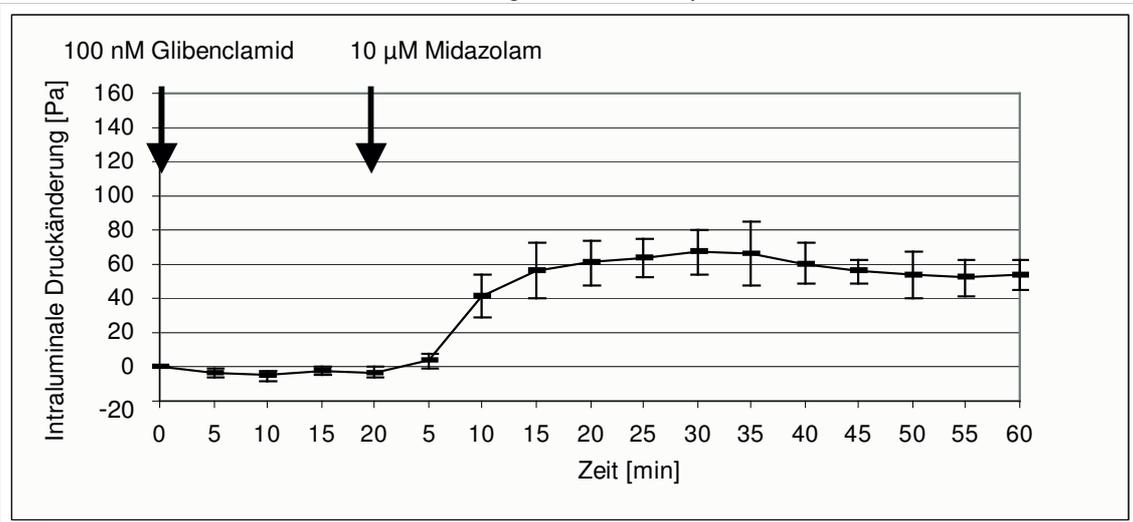


Abb. 40: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 100 nM Glibenclamid

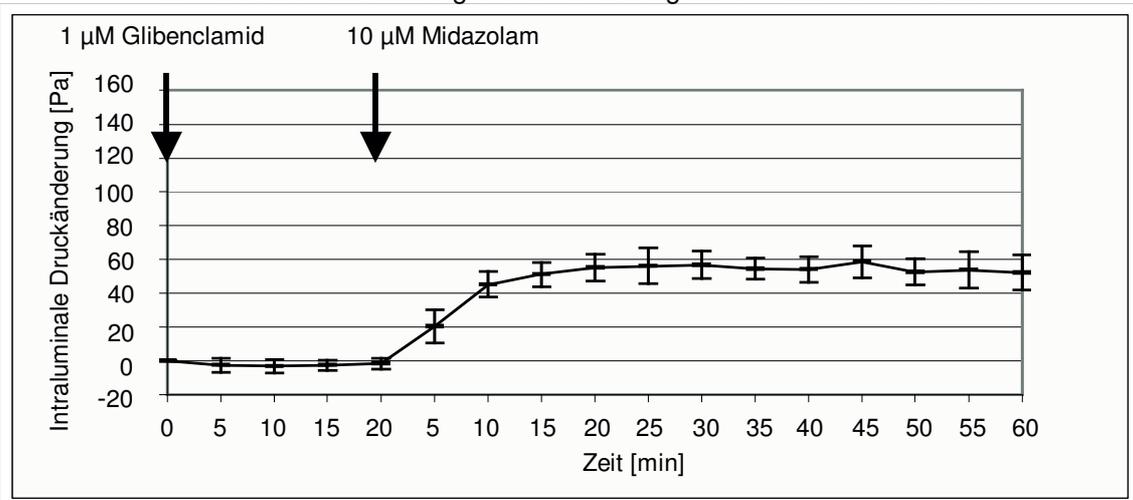


Abb. 41: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 1 µM Glibenclamid

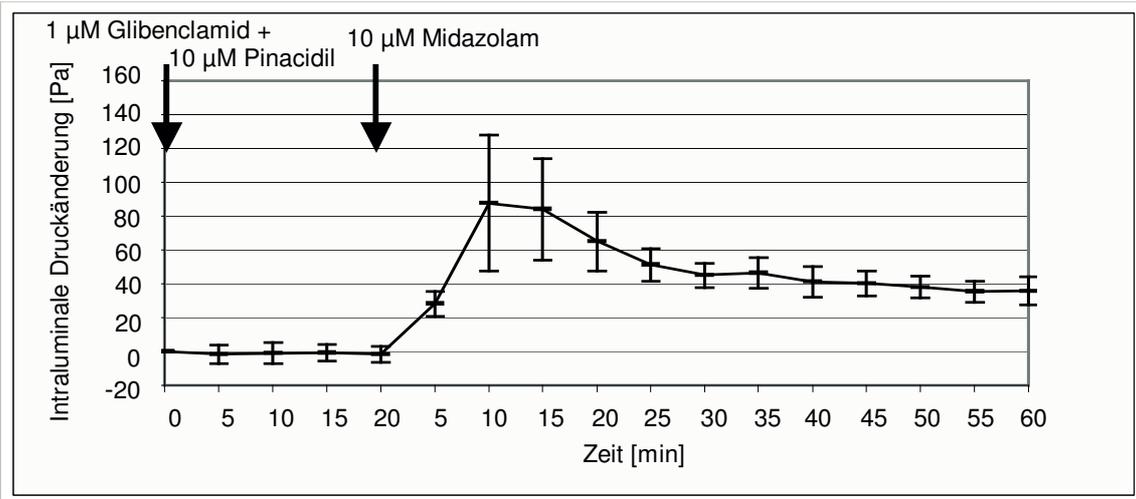


Abb. 42: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei Vorbehandlung mit 1 µM Glibenclamid + 10 µM Pinacidil

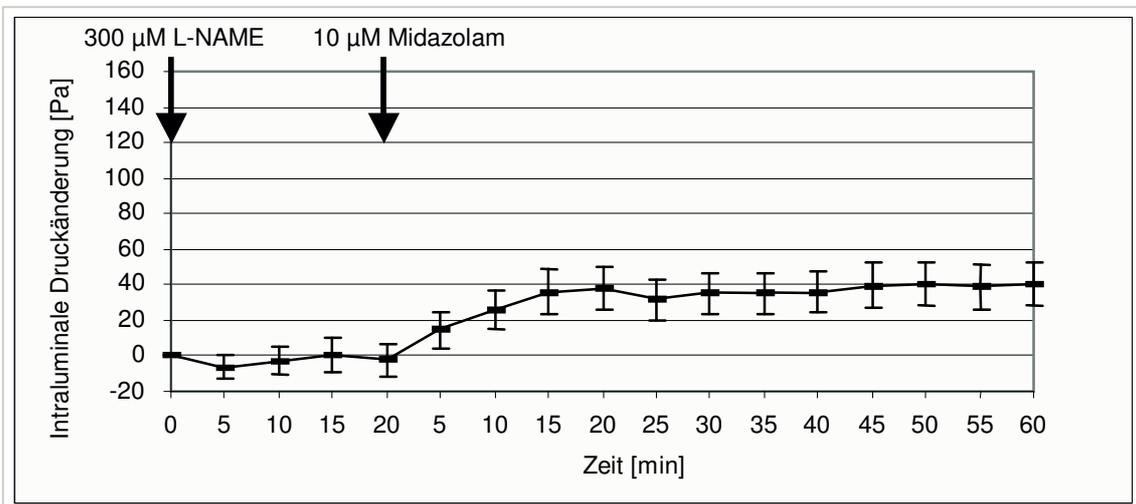


Abb. 43: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 300 µM L-NAME

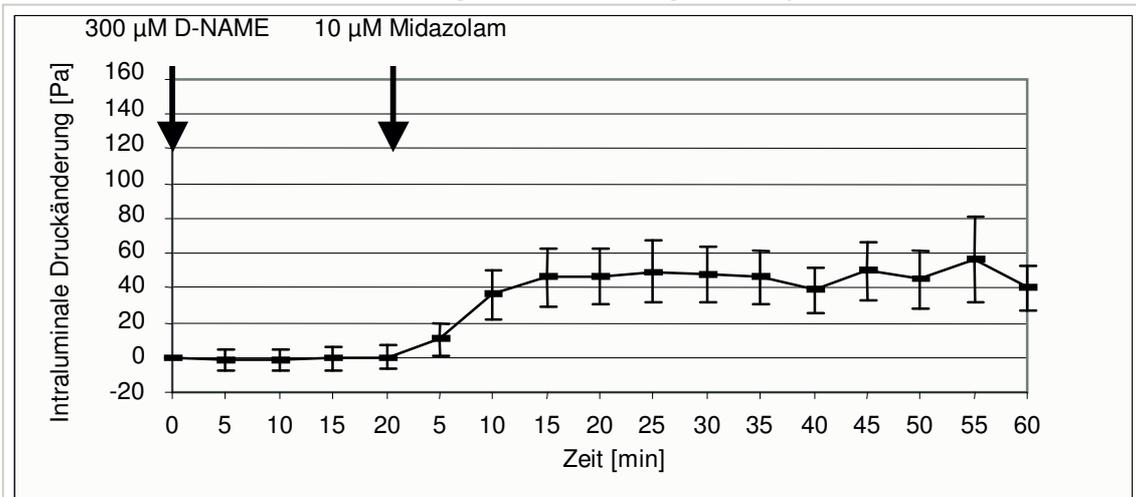


Abb. 44: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 300 µM D-NAME

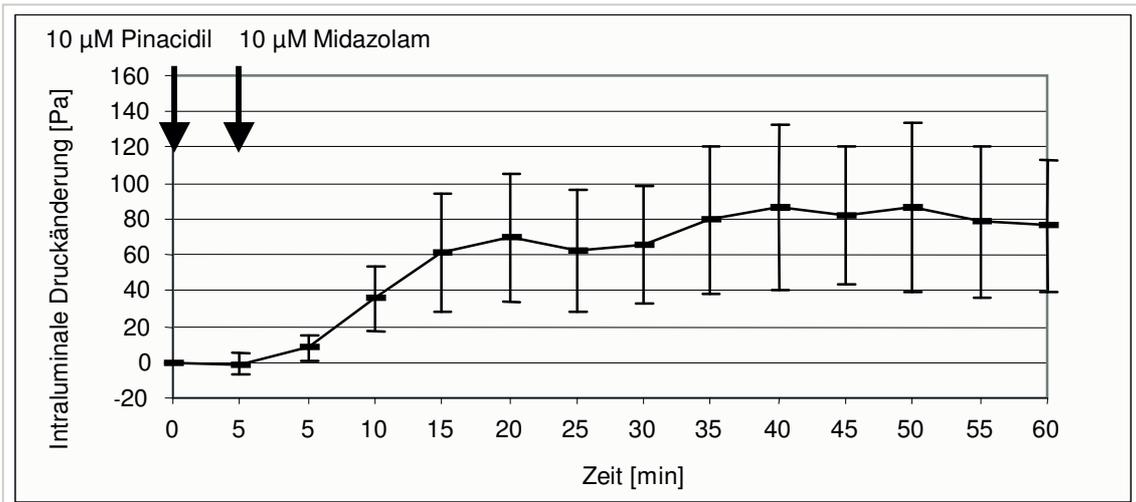


Abb. 45: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 5-minütiger Vorbehandlung mit 10 µM Pinacidil

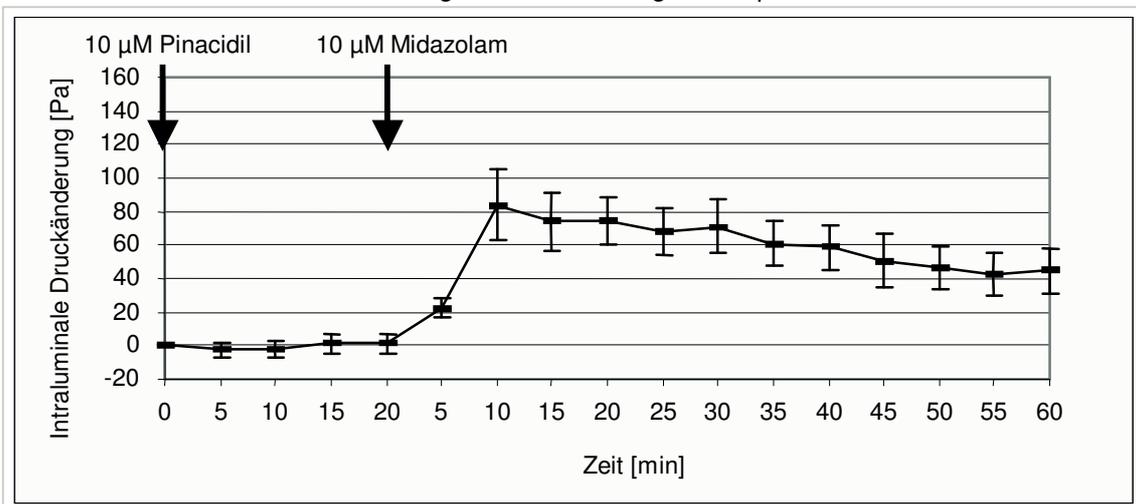


Abb. 46: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 10 µM Pinacidil

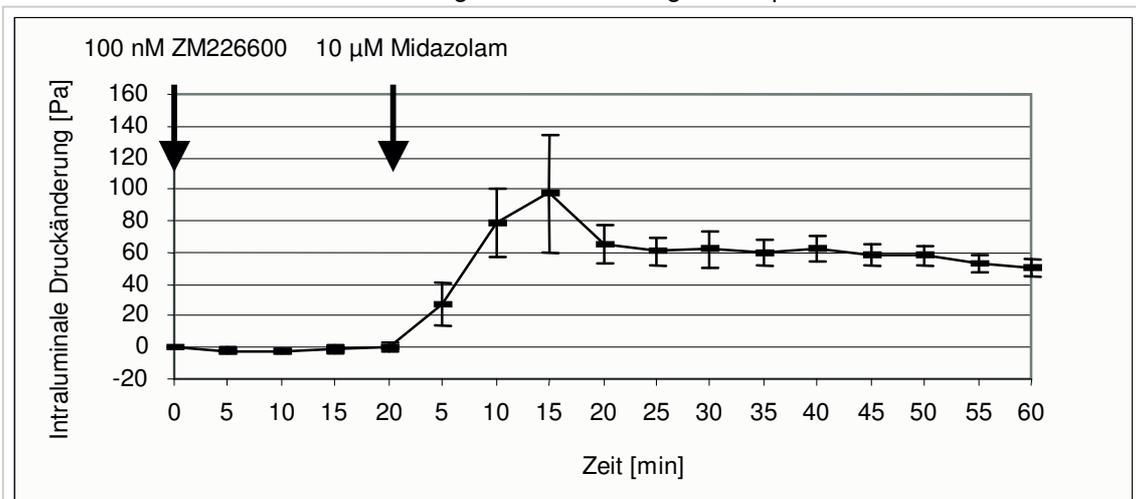


Abb. 47: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 100 nM ZM226600

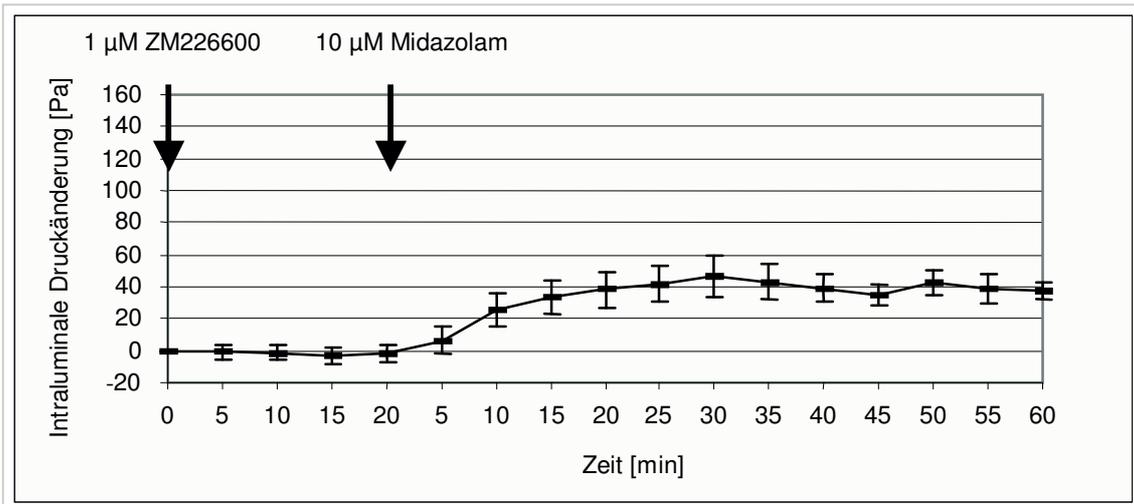


Abb. 48: Registrierung der intraluminalen Druckänderung [Pa] nach Applikation von 10 µM Midazolam bei 20-minütiger Vorbehandlung mit 1 µM ZM226600

8 DANKSAGUNG

Danken möchte ich meinen Eltern und meiner lieben Freundin, deren Geduld, Interesse und Unterstützung das Entstehen dieser Arbeit begleitet haben.

Sehr herzlich danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. K. Herbert für die aufmerksame Betreuung und die tatkräftigen Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente im Labor und der anschließenden Bearbeitung und Formulierung meiner Dissertation. Danken möchte ich ihm auch für seine geduldige und verständnisvolle Art bei der Korrektur.

Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach bin ich sehr verbunden für die Übernahme des Korreferats.

Ein weiterer Dank gilt meinem Cousin Nico, der mit viel Mühe und Engagement die graphische Darstellung des Versuchaufbaus entwickelt hat.

9 LEBENS LAUF

Name, Vorname: Wenderoth, Hardy
Geburtsdatum: 02. März 1973
Geburtsort: Erlenbach am Main
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Ausbildung:

09.1979 - 07.1983 Grundschule 1. – 4. Klasse in Großwallstadt
09.1983 - 07.1984 Teilhauptschule 5. Klasse in Niedernberg
09.1984 - 07.1993 Hermann–Staudinger–Gymnasium Erlenbach a. Main
mit Abschluß Abitur am 9. Juli 1993
05.1994 - 11.2000 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1. Staatsexamen am 28.08.1997
2. Staatsexamen am 10.09.1999
3. Staatsexamen am 17.11.2000

Promotion:

1998 – 2002 Promotion bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M.K. Herbert,
Klinik für Anaesthesiologie der Universität Würzburg
Thema:
Wirkung des Benzodiazepins Midazolam auf die
Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens in vitro

Berufsausübung:

seit 01.12.2000 Arzt im Praktikum an der Klinik für Anaesthesiologie
und operative Intensivmedizin am Klinikum
Aschaffenburg

9 LEBENS LAUF

Name, Vorname: Wenderoth, Hardy
Geburtsdatum: 02. März 1973
Geburtsort: Erlenbach am Main
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Ausbildung:

09.1979 - 07.1983 Grundschule 1. – 4. Klasse in Großwallstadt
09.1983 - 07.1984 Teilhauptschule 5. Klasse in Niedernberg
09.1984 - 07.1993 Hermann–Staudinger–Gymnasium Erlenbach a. Main
mit Abschluß Abitur am 9. Juli 1993
05.1994 - 11.2000 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1. Staatsexamen am 28.08.1997
2. Staatsexamen am 10.09.1999
3. Staatsexamen am 17.11.2000

Promotion:

1998 – 2002 Promotion bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M.K. Herbert,
Klinik für Anaesthesiologie der Universität Würzburg
Thema:
Wirkung des Benzodiazepins Midazolam auf die
Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens in vitro

Berufsausübung:

seit 01.12.2000 Arzt im Praktikum an der Klinik für Anaesthesiologie
und operative Intensivmedizin am Klinikum
Aschaffenburg