

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

Die Aktivierung von *Protease-activated Receptors (PARs)* mit selektiven  
Liganden hemmt die Dünndarmmotilität *in vitro*

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Kerstin Hoppe  
aus Mainaschaff i. Ufr

Würzburg, Februar 2009

Referent: Professor Dr. med. M. Herbert

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

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2009

Die Promovendin ist Ärztin.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1. Versuchsaufbau	9
2.2. Versuchsablauf	10
2.3. Substanzen, Konzentrationen, Versuchsreihen	13
2.4. Auswertung	19
2.5. Statistik	21
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1. Wirkung physiologischer Liganden an PAR	22
3.1.1. Thrombin Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	22
3.1.2. Trypsin Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	23
3.2. Wirkung synthetisch hergestellter Liganden	24
3.2.1. TRAP Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	24
3.2.2. TRAP Orginalregistrierungen	25
3.2.3. TRAP Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Zeitverlauf	27
3.2.4. TRAP Konzentrations-Wirkungs-Beziehungs-Kurve des Anstiegs der PPT in %	28
3.2.5. SLIGRL Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	29
3.2.6. SLIGRL Orginalregistrierungen	30
3.2.7. SLIGRL Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Zeitverlauf	32
3.2.8. SLIGRL Konzentrations-Wirkungs-Beziehungs-Kurve des Anstiegs der PPT in %	33

3.2.9. Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Agonisten an PAR1	34
3.2.10. Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Agonisten an PAR2	35
3.3. Aufhebung der Ligandenwirkung (synthetisch hergestellt) durch einen Antagonisten (synthetisch hergestellt)	36
3.3.1. SCH79797 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	36
3.3.2. SCH79797 – Interaktion mit TRAP	37
3.3.3. SCH79797 – Interaktion mit SLIGRL	38
3.4. Aufhebung der Ligandenwirkung (synthetisch hergestellt) durch Vorbehandlung mit Antagonisten vermuteter Mediatoren	39
3.4.1. TRAP – Antagonisierung der Wirkung durch Apamin und Naloxon	39
3.4.2. SLIGRL – Antagonisierung der Wirkung durch Apamin und Naloxon	41
3.5. Interaktionen der Liganden an PAR1 und 2 mit Midazolam	43
3.5.1. Endogene Liganden – Midazolam	43
3.5.2. Synthetische Liganden – Midazolam	44
3.5.3. PAR1 Liganden – Midazolam: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Zeitverlauf	45
3.5.4. PAR2 Liganden – Midazolam: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Zeitverlauf	46
3.6. Interaktionen der synthetisch hergestellten Liganden mit Fentanyl	47
<b>4. Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>

**7. Anhang**

**81**

**8. Danksagung**

**9. Lebenslauf**

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

DAG	Diacylglycerin
ENS	Enterisches Nervensystem
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pa	Pascal
PPT	“Peristaltic pressure threshold” (=Druckschwelle)
$\Delta$ PPT	Mittelwert der PPT aus dem Vorlauf, subtrahiert von allen anderen Mittelwerten
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PAR-AP	Protease Rezeptor aktivierendes Aminoepitop
PKC	Proteinkinase C
MOV	Multiorganversagen
SEM	Standardfehler
SIRS	systemisch inflammatorisches „response syndrom“
SLIGRL	PAR-AP für PAR2
SP	Substanz P
TRAP	„Thrombin receptor activating peptide“ (PAR-AP für PAR1)
VIP	„Vasoaktives intestinales Polypeptid“

## 1. Einleitung

Eine Vielzahl von bisher im Einzelnen kaum untersuchten Faktoren können im Rahmen operativer Eingriffe und intensivmedizinischer Interventionen zu Störungen der Magen-Darm-Passage führen. Diese sind häufig unvermeidbar, um eine Operation zu ermöglichen oder lebensbedrohliche Zustände adäquat zu therapieren (Herbert, 1999a). Als Hauptpathomechanismen werden neben einer Hyperaktivität der inhibitorischen sympathischen Reflexbahnen und einer Aktivierung inhibitorischer nicht-adrenerger-nicht-cholinerg (NANC)-Neurone, die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch chirurgische Reize herangezogen (De Jonge et al 2004, De Jonge et al 2003, Bauer et al 2002, Boeckxstaens et al 1999, Kalff et al 1999). Die Wirkung zahlreicher Pharmaka, v.a. Anästhetika und Opioide, humoraler Faktoren sowie Neuropeptiden stellen weitere Ursachen einer intestinalen Dysfunktion dar (Gutt 2005, Luckey et al. 2003, Kurz et al. 2003, Holte et al. 2002, DeWinter 2002, Herbert 2001, Ogilvy et al. 1995). In der Regel handelt es sich bei der Darmatonie um einen vorübergehenden, selbstlimitierenden Zustand, welcher allerdings auch in einen prolongierten Verlauf münden und somit schwerwiegende Komplikationen initiieren kann. Eine gestörte gastrointestinale Funktion führt zu einem erhöhtem intraluminalen Druck mit anschließender Invasion neutrophiler Granulozyten in die Lamina muscularis. Hierdurch wird eine direkte Schädigung der Muskelzellen durch Freisetzung von Zytokinen und proteolytischen Enzymen induziert. Somit kann der Darm Fokus eines SIRS (systemisch inflammatorisches „response syndrom“) werden (Brünnler 2008, Stewart et al. 2007, Ragaller et al. 2005, Madl et al. 2003). Die Schädigung der mukosalen Schutzbarriere des Darms kann zusammen mit einer steigenden Bakterienzahl eine Permeation von Bakterien und Endotoxinen aus dem Intestinaltrakt begünstigen. Mögliche Folgen sind ein Septisches Syndrom oder schlimmstenfalls ein Multiorganversagen (MOV) (Baron et al. 1994, Ding et al. 2003, Herbert 2008, Stechmiller et al. 1997, Ziegler et al. 1988). Auch eine signifikant höhere Rate von tiefen Beinvenenthrombosen und Lungenembolien nach Hüft -oder Kniearthroplastik wurde bei gleichzeitig bestehender intestinaler Dysfunktion nachgewiesen (Berend et al. 2004). Die

therapeutischen Optionen zur Behandlung von Motilitätsstörungen bei Intensivpatienten sind noch immer limitiert (Fruhwald et al. 2007, Ritz et al. 2000). Deshalb ist zur Entwicklung neuer Therapieoptionen die Untersuchung weiterer zugrunde liegender physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen nötig.

Anfang der 90iger Jahre wurde eine neue Klasse von Rezeptoren sog. Protease-activated-Receptors (PARs) entdeckt (Vu et al. 1991). Diese sind in einer Vielzahl von Geweben wie Niere, Leber, Prostata, Ovar, Auge, Pankreas und Gastrointestinaltrakt lokalisiert (Schmidlin et al. 2001). Bei letzterem konnten sie in Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, enterischen Neuronen, Fibroblasten und einigen Zellen des Immunsystems (Neutrophilen, Mastzellen, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen) nachgewiesen werden (Vergnolle 2005). Es handelt sich um G-Protein gekoppelte sieben-transmembran Domänenrezeptoren (Vergnolle et al. 2003). Nach Bindung einer Protease erfolgt die Aktivierung der Rezeptoren durch spezifische irreversible proteolytische Abspaltung ihrer extrazellulären N-terminalen Domäne. Diese Abspaltung setzt einen neuen N-terminus frei, welcher als „gebundener Ligand“ agiert, extrazellulär am 2-Loop des selben Rezeptors bindet, sich selbst aktiviert, um anschließend ein intrazelluläres Signal zu induzieren (Abb. 1) (Vergnolle 2005, Trejo 2003, Macfarlane et al. 2001). Gegenwärtig umfasst die Familie der PARs vier Mitglieder: PAR1-4. Die koagulatorisch wirkende Protease Thrombin ist der physiologisch bedeutendste Ligand von PAR1, PAR3 und PAR4 (Vergnolle 2004, O'Brien et al. 2001, Coughlin 2000). Die Signaltransduktion von PAR2 wird durch Serinproteasen wie Trypsin, Trypsinase, die Gerinnungsfaktoren VIIa und Xa initiiert (Coughlin et al. 2003). Synthetisch hergestellte Peptide, sog. PAR-APs bestehend aus 5 oder 6 Aminosäuren, die der Domäne des „angebundenen Liganden“ von PAR1, PAR2 und PAR4 entsprechen, können die Rezeptoren selektiv und direkt ohne vorherige Abspaltung eines N-Terminus aktivieren (Hollenberg et al. 2002, Schmidlin 2001, Vergnolle 2000, Kawabata et al. 1999a, Blackhart et al. 1996, Vassallo et al. 1992, Seiler et al. 1992, Huang et al. 1991). Aufgrund dieses Mechanismus

können durch PAR-APs (Protease Rezeptor aktivierendes Aminoepitid) aktivierte Rezeptoren weiterhin durch natürliche Agonisten aktiviert werden.

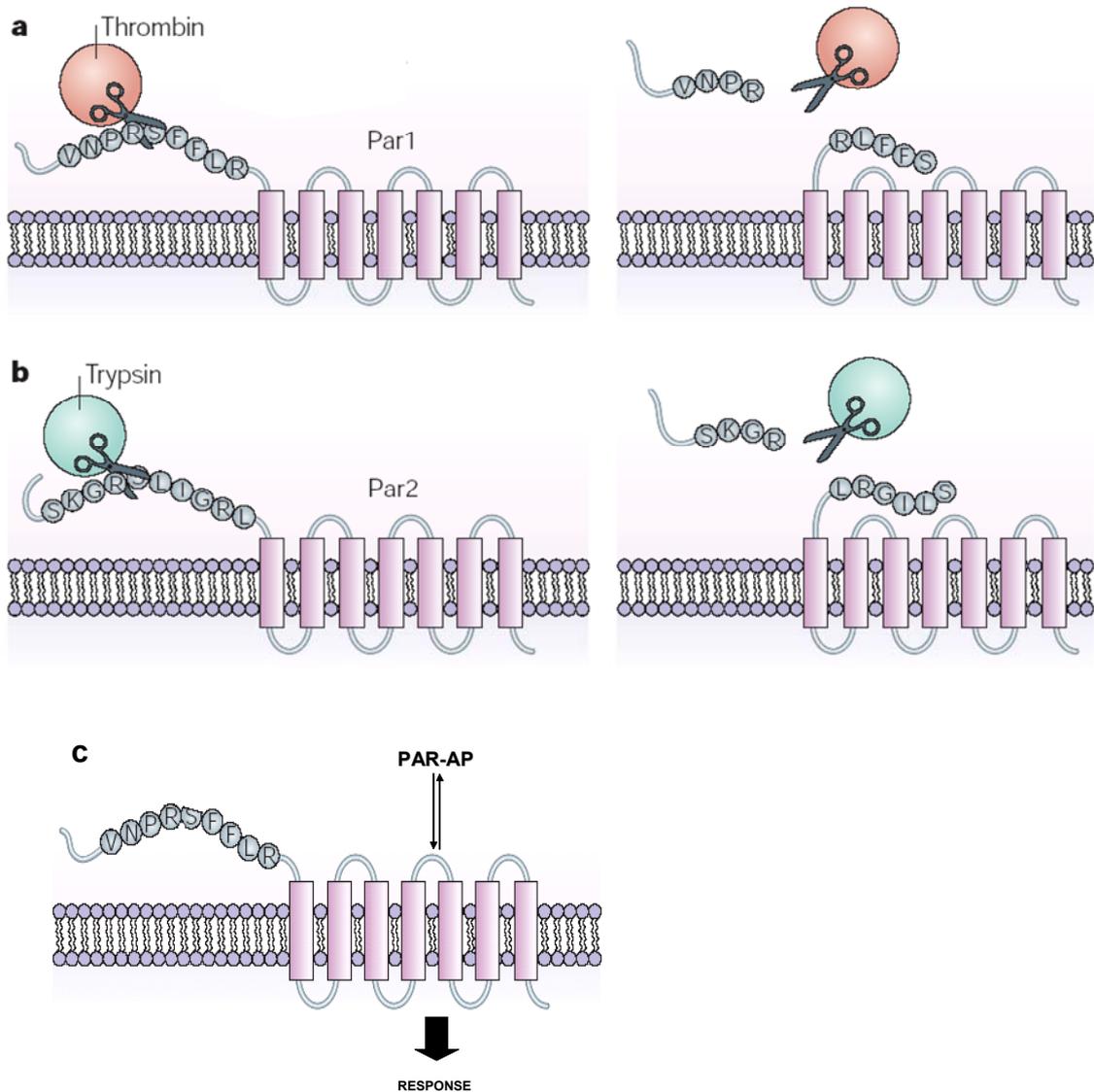


Abb.1: Die Proteasen Thrombin (Abb. 1a) und Trypsin (Abb. 1b) spalten die N-terminale Domäne des PAR. Das somit freigesetzte Ende bindet an den gleichen Rezeptor und aktiviert diesen. PAR-APs (Abb. 1c) aktivieren die Rezeptoren ohne vorherige Spaltung. Quelle: modifiziert nach Noorbahsh et al. 2003.

	<i>PAR<sub>1</sub></i>	<i>PAR<sub>2</sub></i>
<b>Activating proteases</b>	Thrombin, trypsin, plasmin, cathepsin G, granzyme A, factors Xa and VIIa, gingipain	Trypsin, mast cell Tryptase, trypsin-2, trypsin VI, tissue factor, matriptase/membrane-type serine protease I, factors Xa and VIIa, gingipain, acrosin, dust mite proteases
<b>Activating proteases (EC 50)</b>	Thrombin (50 pM)	Trypsin (1 nM) Tryptase (1 nM)
<b>Selective peptidic agonists</b>	TFLLR, ApfFRChaCitY, TFRID (xenopus)	SLIGRL, SLIGKV, trans-cynamoyl-LIGRLO, 2-furoyl-LIGRLO
<b>Antagonists</b>	RWJ-56110, RWJ-58259, SCH-79797, SCH-73754, FR-171113, BMS-200261	
<b>Location in the GI tract</b>	Enterocytes, myenteric neurones, submucosal neurones, fibroblasts, mast cells, smooth muscle, endothelium, human colon cancer epithelium, immune cells	Enterocytes, myenteric neurones, submucosal neurones, fibroblasts, mast cells, smooth muscle, endothelium, human colon cancer epithelium, pancreatic duct epithelium, pancreatic acinar cells, immune cells
<b>Known effects in the GI tract</b>	Increased permeability, apoptosis, ion secretion, prostaglandin release, proliferation, and cell motility, smooth muscle contraction/relaxation, inflammation	Ion secretion, prostaglandin and eicosanoid release, neuropeptide release, neuronal hyperexcitability, amylase secretion, ion channel activation, inflammation, visceral hypersensitivity, motor functions

Abb. 2: Quelle: modifiziert nach Vergnolle 2005 und O'Brien 2001

Konformationsänderungen des Rezeptors, verursacht durch Bindung eines Signalstoffs, lösen Interaktionen mit G-Proteinen aus (Dery et al. 1998). Diese fungieren als Vermittler und übertragen die Signale des aktivierten Rezeptors an intrazelluläre Effektorproteine, wodurch die Konzentration von Ionen und Second messengern verändert wird. G-Proteine sind Heterotrimere aus drei verschiedenen Untereinheiten:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die  $\alpha$ -Untereinheit kann ein Guaninnukleotid, entweder GDP oder GTP binden. Der aktivierte

Rezeptorkomplex, dient als GEF (Guanin nucleotid exchange factor) und veranlasst die  $\alpha$ -Untereinheit zum Austausch des im Ruhezustand gebundenen GDP gegen GTP. Hierdurch zerfällt das G-Protein in die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Einheit. Die mit GTP beladene  $\alpha$ -Untereinheit sowie die  $\beta\gamma$ -Einheit assoziieren mit den für die Signalantwort erforderlichen Effektorproteinen, wie beispielsweise der Adenylatzyklase, Phospholipase C, der Phosphatidylinositol-3-Kinase oder der Rho-Kinase. Die durch die beiden Untereinheiten induzierte Modulation des Signalwegs ist voneinander unabhängig und kann synergistische sowie antagonistische Effekte initiieren (Neer et al. 1988). Eine intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit führt zur Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP und beendet somit das Signal. Die GDP beladene  $\alpha$ -Untereinheit kehrt in den inaktiven Zustand zurück und assoziiert mit den  $\beta\gamma$ -Untereinheiten sowie dem Rezeptor.

Über diese Signalwege modifizieren PAR Zellteilung, -proliferation, -migration, -sekretion und -transkription (Coughlin 2000). PAR1 koppelt zahlreiche verschiedene vom Zelltyp abhängige G-Proteine, Effektorenzyme und Signalwege (Grand et al. 1996), speziell  $G_q$ ,  $G_{12/13}$  und  $G_i$  (Ossovskaya et al. 2004). (Weitere Details siehe Anhang)

Die Bindung von Agonisten an PAR2, PAR3 und PAR4 verursacht einen Anstieg von  $IP_3$  und eine  $Ca^{2+}$ -Mobilisation in zahlreichen Zelltypen (Shapiro et al. 2000, Ishihara et al. 1997, Schultheiss et al. 1997, Böhm et al. 1996), wobei hier eine  $G_q$ -Kopplung vermutet wird (Ossovskaya et al. 2004, Trejo 2003). Eine Aktivierung von PAR2 verursacht zudem eine Freisetzung von Arachidonsäure und eine Erzeugung der Prostaglandine  $E_2$  und  $F_1$  in verschiedenen Geweben (Kawabata et al. 2005, Asokanathan et al. 2002, Kong et al. 1997). Prostaglandine sind an einer Vielzahl von Prozessen zur Regulation der Magen-Darm-Funktion, wie Sekretion, Transport und Motilität beteiligt (Vergnolle 2000, Eley et al. 1977). *In vitro* Studien isolierter intestinaler Muskelzellen zeigen eine durch  $PGE_2$  induzierte Kontraktion des longitudinalen Muskels und eine Relaxation des Ringmuskels (Eberhardt et al. 1995). Auch

eine Kopplung von PAR2 mit SAP Kinasen, JNK und p38MAP Kinasen konnte nachgewiesen werden (Sabri et al. 2000).

Serinproteasen sind proteolytische Enzyme mit einer für diese Gruppe der Proteasen typischen Triade Serin-Histidin-Aspartat im aktiven Zentrum. Um eine „Selbstverdauung“ zu verhindern werden die meisten proteolytischen Enzyme als inaktive Proenzyme (Zymogen) ausgeschüttet. Die Aktivierung eines Zymogens ist irreversibel und kann nur durch spezifische Proteaseinhibitoren deaktiviert werden (Steinhoff et al. 2005, Koolmann 2002). Der Gastrointestinaltrakt ist gegenüber Proteasen besonders exponiert. Neben der Freisetzung von Proteinasen im Rahmen der Verdauung oder durch Bakterien unter physiologischen Bedingungen, werden Proteasen besonders während akuten Entzündungsreaktionen und bei Aktivierung der Gerinnungshemmerkaskade in gesteigerten Mengen freigesetzt (Cattaruzza et al. 2006, Amadesi et al. 2004). Somit könnten PAR eine entscheidende Schlüsselfunktion der bidirektionalen Interaktionen zwischen der Gerinnungskaskade und der Entzündungsreaktion einnehmen (Schouten et al. 2008, Pawlinski et al. 2004, Riewald et al. 2003).

Wie oben erwähnt wurden PARs in zahlreichen Präparationen verschiedener Tierspezies auf glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen. Es ist denkbar, dass diese direkt oder durch Interferenz mit den intestinalen Schrittmacherzellen (Intestinal Cell of Cajal, ICC), die Darmmotilität beeinflussen (Gao et al. 2002, Goyal et al. 1996, Kawabata et al. 2000a, 2000b, Kellow et al. 1999, Cocks et al. 1999, Hollenberg et al. 1993, Wood et al. 1999). In bisherigen experimentellen Studien wurden durch Aktivierung von PARs sowohl Relaxationen als auch Kontraktionen sowie biphasische Reaktionen des Darms hervorgerufen (Mule et al. 2002, Kawabata et al. 1999a, 2000a, Cocks et al. 1999, Covera et al. 1997, Hollenberg et al. 1997, Saifeddine et al. 1996, Al-Ani et al. 1995).

Ein weiterer Angriffspunkt zur Modulationen der Peristaltik durch Serinproteasen stellt das enterische Nervensystem (ENS) dar. Dieses enthält

eine Vielzahl verschiedener Neuronentypen, die drei Hauptgruppen zugeordnet werden können: primär afferente Neurone, Interneurone sowie exzitatorische und inhibitorische Motorneurone. Komplexe Interaktionen zwischen diesen Populationen stellen die Grundlage des peristaltischen Reflexes dar (Brehmer 2006, Schemann 2005, Furness 2000). Die Neurone sind in zwei Plexus angeordnet. Der Plexus myentericus innerviert die Tunica muscularis des GI-Trakts und steuert somit dessen Motilität. Der Plexus submucosus ist in der Tela submucosa lokalisiert, reguliert dort die Funktionen der Mucosa, wobei jedoch in einigen Spezies inklusive Mensch, Hund und Ratte auch Projektionen in die zirkuläre Muskelschicht nachgewiesen wurden (Grider 1999). PAR konnten in Neuronen beider Plexus nachgewiesen werden (Reed et al. 2003, Gao et al. 2002, Covera et al. 1999). Neuronen des ENS können entsprechend ihrem elektrophysiologischen Verhalten eingeteilt werden. Zum einen in primär afferente Neurone, die durch Nachhyperpolarisation (AH-Typ) charakterisiert sind, was ihre Erregbarkeit herabsetzt. Zum anderen in Interneurone und Motorneurone, die mit schnellen postsynaptischen Potentialen (S-Typ) auf Stimulation antworten (Grundy et al. 2005, Goyal et al. 1996, Furness et al. 1987). Bisherige Untersuchungen zeigen eine Erregbarkeit dieser Neuronen durch Trypsin, Thrombin sowie selektive Agonisten von PAR1, PAR2 und PAR4 auf (Gao et al. 2002). Ein großer Anteil von ihnen enthält Neurotransmitter mit exzitatorischer Wirkung auf die glatte Muskulatur wie SP und/oder inhibitorischer Wirkung wie VIP und NO (Covera et al. 1999). Somit könnte eine Hemmung der Darmmotilität durch Aktivierung von inhibitorischen deszendierenden, NO oder VIP enthaltenden Motorneuronen durch PAR-Agonisten initiiert werden (Ossovszkaya et al. 2004).

Auch über immunologische Mechanismen kann die gastrointestinale Funktion durch PAR moduliert werden. Die Zugabe von PAR1- und PAR2-Agonisten ins Mauscolon führte zu einer Entzündungsreaktion mit Granulozyteninfiltration und submucosalem Ödem. Im Gegensatz zu PAR2 konnte für PAR1 gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um eine Aktivierung sensorischer

Nervenfasern mit anschließender Freisetzung von Neuropeptiden handelt (Vergnolle 2005, Vergnolle 2004, Cenac 2003, Nguyen 2003).

Ziel der vorliegenden Studie ist, die Wirkung von PAR nach deren Aktivierung durch endogene und synthetische Liganden auf die Dünndarmmotilität zu beschreiben. Mittels Antagonisten an PAR und Antagonisten vermuteter endogener Mediatoren wurden die Mechanismen, über den die Rezeptoren ihre Wirkung auf die Motilität vermitteln, untersucht. Ferner interessiert, ob die motilitätshemmende Wirkung von Midazolam und Fentanyl durch Aktivierung von PARs beeinflusst wird.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchsaufbau**

Zur *in vitro* Untersuchung der Peristaltik wurde Dünndarm weiblicher und männlicher Meerschweinchen (Lieferant Charles River Wiga) mit einem Gewicht von 300g bis 600g verwendet. Nach Betäubung der Tiere durch Genickschlag erfolgte die Tötung durch Entblutung aus den Karotiden. Nach Eröffnen des Peritoneums erfolgte die Entnahme des distalen Jejunums und Ileums ab ca. 10 cm oralwärts der Ileocoecalclappe. Das aborale Ende wurde mittels eines Fadens gekennzeichnet, um die von oral nach aboral gerichtete Einspannung des Darmsegments zu gewährleisten.

Der Darm wurde bis zur Verwendung in einem mit Tyrodelösung (37°C) gefüllten Becherglas aufbewahrt und mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> oxygeniert. Die Segmente konnten in der Tyrodelösung bis zu fünf Stunden ohne Beeinträchtigung der Peristaltik aufbewahrt werden (Holzer et al. 2003). Die Tyrodelösung besteht aus (in mM): NaCl 136.9, KCl 2.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 11.9, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 und Glukose 5.6.

Der Dünndarm wurde in Segmente von jeweils ca. 8-10 cm Länge unterteilt. Zur Untersuchung der Peristaltik wurde das jeweilige Segment oralwärts an ein Zufluss- und analwärts an ein Abflussröhrchen angeschlossen und in ein mit 30 ml Tyrodelösung befülltes silanisierendes Glasorganbad eingebracht (Abb.4). Über das Zuflussröhrchen konnte der Darm mit Hilfe einer Pumpvorrichtung kontinuierlich mit 0.5 ml/min Tyrodelösung perfundiert werden. Am Abflussröhrchen war ein T-Stück befestigt, wovon ein Arm 4,0 cm über dem Niveau des Darmsegments endete. Dieser Aufbau ermöglicht peristaltische Kontraktionen und die Entleerung des Darms (Bülbring et al. 1958). Der zweite Arm führte zum Druckwandler (Combitans, Firma Braun), mit dem der intraluminale Druck registriert wurde. Nach Verstärkung des Signals (PeriCo, Firma BioMEDRS) wurde dieses auf einem 6-Kanal-Schreiber (Multi-Pen, Firma Rikadenki) aufgezeichnet.

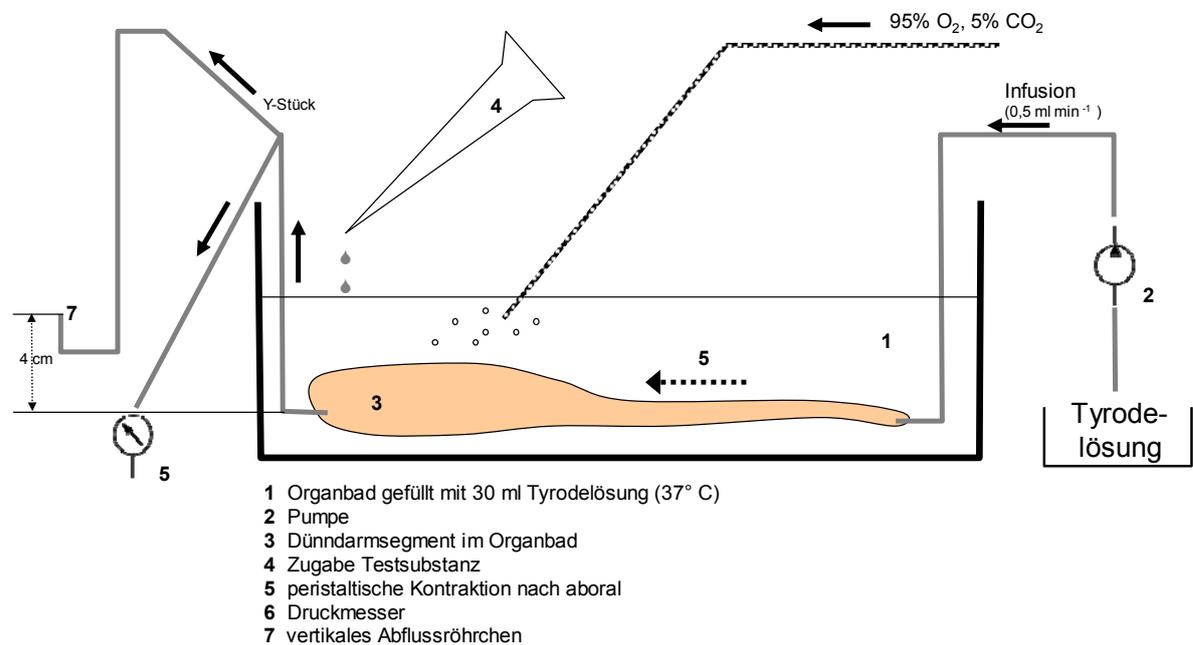


Abb. 4: Aus einem Vorratsgefäß wird die Tyrodelösung über eine Rollerpumpe (2) mit 0,5 ml/min in das Darmsegment (3) infundiert. Dieses befindet sich in einem mit Tyrodelösung befüllten Organbad (1). Bei Auslösung einer peristaltischen Welle (3) wird die Tyrodelösung durch ein 4 cm über dem Badniveau endenden Abflussröhrchen (7) abgeleitet. Dieses Abflussröhrchen ist mit dem Druckaufnehmer (5) verbunden, wodurch intraluminale Druckveränderungen registriert werden können.

## 2.2 Versuchsablauf

Zu Beginn des Versuchs wurde das jeweilige Segment im Organbad für 30 min äquilibriert. Die vertikale Ausrichtung des Abflussröhrchens musste hierzu auf Niveau des Dünndarms eingestellt werden, d.h. auf einem hydrostatischen Druck von 0 Pa, um einen Kontraktionsanreiz zunächst auszuschließen. Die Segmente wurden horizontal im Organbad eingebracht und nach einer 10 minütigen Ruhephase kontinuierlich mit Tyrodelösung perfundiert. Die Tyrodelösung im Organbad wurde zweimal erneuert, zuerst nach Ablauf der 10-minütigen Ruhephase und anschließend nach Ablauf der 30-minütigen Äquilibrierungsphase. Um den Darm von Luftblasen sowie verbliebenem Inhalt zu befreien, wurde er mehrmals vorsichtig mittels Tyrodelösung durchgespült. Nach Abschluss der Äquilibrierungsphase wurde das Druckniveau des

vertikalen Abflussröhrens auf 400 Pa angehoben, um somit den zur Auslösung des peristaltischen Reflexes erforderlichen intraluminalen Druck zu erzeugen. Die kontinuierliche Perfusion des Darms mit Tyrodelösung erhöhte allmählich den intraluminalen Druck. Bei Erreichen der „peristaltic pressure threshold“ (PPT) wurde eine von oral nach aboral verlaufende peristaltische Kontraktionswelle ausgelöst.

Eine peristaltische Kontraktion lässt sich in zwei Phasen einteilen (Abb. 5). Während der Füllungsphase (= präparatorische Phase) wird der Darm kontinuierlich mit Tyrodelösung gegen einen Widerstand von 400 Pa gefüllt. Hierbei nimmt der intraluminale Druck linear bis zu einem Schwellenwert (PPT) zu. Die Überschreitung des Schwellenwerts induziert eine peristaltische Kontraktion mit spikeförmigem Druckanstieg, wodurch sich der Darm entleert (Entleerungsphase), der intraluminale Druck anschließend zum Ausgangswert zurückkehrt und der Zyklus von neuem startet (Kosterlitz et al. 1964, Waterman et al. 1992)

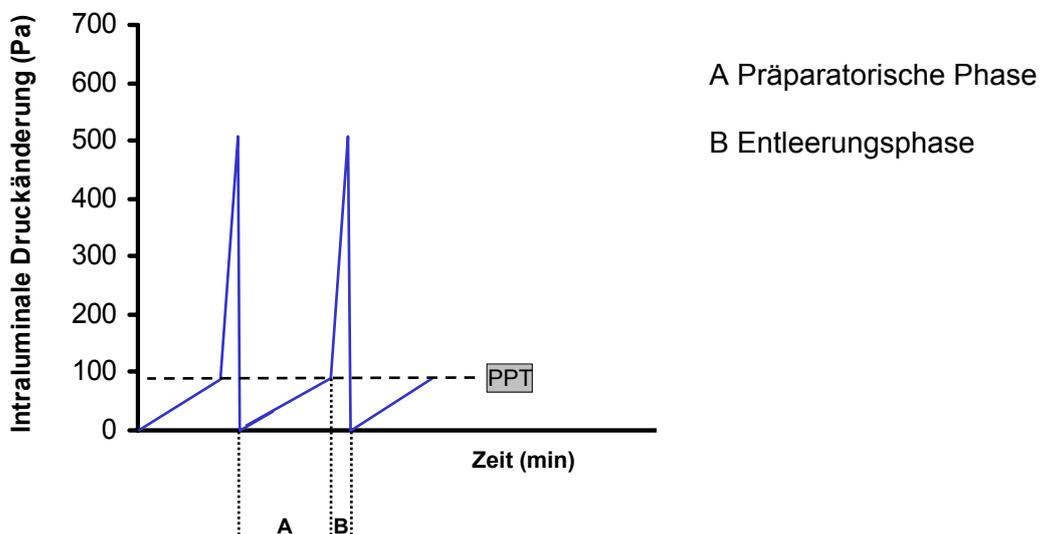


Abb.5: Schematische Darstellung des Phasenverlaufs einer peristaltischen Kontraktion  
modifiziert nach Waterman et al. 1992, Holzer et al. 1994

Die ersten 30 min der Registrierung dienten der Anpassung der Darmsegmente an das neue Druckniveau. Nachdem sich eine regelmäßige nach aboral gerichtete Peristaltik eingestellt hat, wurden mindestens fünf gleichartige

Kontraktionen (Vorlauf) aufgezeichnet. Parameter einer regelmäßigen Peristaltik waren Gleichartigkeit bezüglich der Frequenz, des Schwellendrucks (PPT) sowie des intraluminalen Drucks. Im Anschluss an die fünf gleichartigen Kontraktionen erfolgte die Zugabe der jeweils zu testenden Substanz. Diese wurde extraserosal ins Organbad appliziert, wobei das hierdurch zugeführte Volumen maximal 1% des gesamten Volumens im Organbad nicht überschritt (Holzer et al. 1994, Holzer et al. 1997). Die Zugabe einer weiteren Substanz erfolgte anhand eines standardisierten Protokolls nach 20 min. Alle Substanzen wurden an verschiedenen Abschnitten des Dünndarms untersucht. Jede Substanz bzw. Substanzkombination wurden an sechs bis acht Segmenten verschiedener Tiere getestet, wobei jedes Segment nur für eine Substanzkombination verwendet wurde. Alle Substanzen waren in Tyrodelösung verdünnt, demzufolge wurde in Kontrollexperimenten nur Tyrodelösung in das Bad zupipettiert. Nach Ablauf des standardisierten Versuchszeitraums erfolgt nach Abschaltung der Perfusion die Kalibrierung. Hierfür wurden zwei Referenzpunkte bestimmt. Der Druck im Organbad auf Niveau des Darmsegments diente als Nullwert. Der Druck 4 cm Wassersäule über dem Niveau des Darmsegments im Organbad wurde als zweiter Referenzwert bestimmt. Anhand dieser beiden Punkte wurde der Kalibrierungsfaktor ermittelt.

### 2.3. Substanzen, Konzentrationen, Versuchsreihen

Für die verwendeten Substanzen sind angegeben: Name, Lieferant, Funktion der Substanz und getestete Konzentration. Die Verdünnungsstufen wurden mit Tyrodelösung hergestellt.

Name	Lieferant (Firma)	Funktion der Substanz	Getestete Konzentration
Thrombin	Sigma-Alderich	endogener Ligand an PAR1	1-10-100-1000nM
Trypsin	Sigma-Alderich	endogener Ligand an PAR2	1-10-100nM
TRAP	Tocris	Synthetischer hergestellter Ligand an PAR1	10-100-1000-10000nM
SLIGRL-NH <sub>2</sub>	Tocris	synthetischer hergestellter Ligand an PAR2	10-100-1000-10000nM
SCH79797-dihydrochloride	Tocris	synthetisch hergestellter Antagonist an PAR1	1-10µM
Apamin	Sigma-Alderich	Antagonist an Ca <sup>2+</sup> abhängigen K <sup>+</sup> -Kanal	0,5µM
Naloxon	Tocris	Antagonist am Opioidrezeptor	0,5µM
Midazolam	Hoffmann-LaRoche	Benzodiazepin	1µM
Fentanyl	Jansen	Opiat	3nM

## **Versuchsreihen**

In separaten Versuchsreihen wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt:

### **Versuchsreihe 1 (Thrombin Konzentrations-Wirkungs-Beziehung)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>		<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	Thrombin	1-10-100-1000nM	n=6
Vorlauf	Tyrodelsg.	1x	n=6

Nach zehnminütiger Vorlaufphase wurde bei je 6 Segmenten entweder das Lösungsmittel (Tyrodelsg.) oder Thrombin in den aufgeführten Konzentrationen in das Organbad appliziert und die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 2 (Trypsin Konzentrations-Wirkungs-Beziehung)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>		<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	Trypsin	1-10-100nM	n=6
Vorlauf	Tyrodelsg.	1x	n=6

Nach zehnminütiger Vorlaufphase wurde bei je 6 Segmenten entweder das Lösungsmittel (Tyrodelsg.) oder Trypsin in den aufgeführten Konzentrationen in das Organbad appliziert und die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 3 (TRAP Konzentrations-Wirkungs-Beziehung)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>		<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	TRAP	10-100-1000-10000nM	n=6
Vorlauf	Tyrodelsg.	1x	n=6

Nach zehnmütiger Vorlaufphase wurde bei je 6 Segmenten entweder das Lösungsmittel (Tyrodelsg.) oder TRAP in den aufgeführten Konzentrationen in das Organbad appliziert und die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 4 (SLIGRL Konzentrations-Wirkungs-Beziehung)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>		<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	SLIGRL	10-100-1000-10000nM	n=6
Vorlauf	Tyrodelsg.	1x	n=6

Nach zehnmütiger Vorlaufphase wurde bei je 6 Segmenten entweder das Lösungsmittel (Tyrodelsg.) oder SLIGRL in den aufgeführten Konzentrationen in das Organbad appliziert und die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 5 (SCH79797 Konzentration -Wirkungs-Beziehung)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>		<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	SCH79797	1-10 $\mu$ M	n=6-7
Vorlauf	Tyrodelsg.	1x	n=6

Nach zehnmütiger Vorlaufphase wurde bei je 6 Segmenten entweder das Lösungsmittel (Tyrodelsg.) oder SCH79797 in einer Konzentration von 1µM in das Organbad appliziert und die Peristaltik über einen Zeitraum von 60 min registriert. Die Applikation der Testsubstanz SCH79797 in einer Konzentration von 10µM in das Organbad erfolgte bei 7 Segmenten.

### **Versuchsreihe 6 (SCH79797 – Interaktion mit TRAP)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>je 60 min</u>		
Vorlauf	Tyrodelsg.	TRAP	100nM	n=6
Vorlauf	1 µM Sch79	TRAP	100nM	n=9

Nach zehnmütiger Vorlaufphase wurden je 6 Segmente für 20 min entweder mit Lösungsmittel (Tyrodelsg.) oder mit SCH79797 1µM vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 100nM TRAP bei 9 Segmenten. Nach Zugabe von TRAP wurde die Peristaltik für weitere 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 7 (SCH79797 – Interaktion mit SLIGRL)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>je 60 min</u>		
Vorlauf	Tyrodelsg.	SLIGRL	100nM	n=8
Vorlauf	1 µM Sch79	SLIGRL	100nM	n=7

Nach zehnmütiger Vorlaufphase wurden je 6 Segmente für 20 min entweder mit Lösungsmittel (Tyrodelsg.) oder mit SCH79797 1µM vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 100nM SLIGRL bei 7 Segmenten. Nach Zugabe von SLIGRL wurde die Peristaltik für weitere 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 8 (TRAP – Antagonisierung der Wirkung)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	Tyrodelsg.	TRAP 100nM	n=6
Vorlauf	0,5µM Apamin	TRAP 100nM	n=6
Vorlauf	0,5µM Naloxon	TRAP 100nM	n=6

Nach zehnmütiger Vorlaufphase wurden je 6 Segmente für 20 min entweder mit Lösungsmittel (Tyrodelsg.), 0,5µM Apamin oder 0,5µM Naloxon vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 100nM TRAP. Nach Zugabe von TRAP wurde die Peristaltik für weitere 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 9 (SLIGRL – Antagonisierung der Wirkung)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	Tyrodelsg.	SLIGRL100nM	n=6
Vorlauf	0,5µM Apamin	SLIGRL100nM	n=6
Vorlauf	0,5µM Naloxon	SLIGRL100nM	n=6

Nach zehnmütiger Vorlaufphase wurden je 6 Segmente für 20 min entweder mit Lösungsmittel (Tyrodelsg.), 0,5µM Apamin oder 0,5µM Naloxon vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 100nM SLIGRL. Nach Zugabe von SLIGRL wurde die Peristaltik für weitere 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 10 (Interaktion – endogene Liganden – Midazolam)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	Tyrodelsg.	Midazolam 10µM	n=6
Vorlauf	100nM Thrombin	Midazolam 10µM	n=6
Vorlauf	100nM Trypsin	Midazolam 10µM	n=6

Nach zehnminütiger Vorlaufphase wurden je 6 Segmente für 20 min entweder mit Lösungsmittel (Tyrodelsg.), 100nM Thrombin oder 100nM Trypsin vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 10µM Midazolam. Nach Zugabe des Midazolams wurde die Peristaltik für weitere 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 11 (Interaktion – synthetische Liganden – Midazolam)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	Tyrodelsg.	Midazolam 10µM	n=6
Vorlauf	100nM TRAP	Midazolam 10µM	n=6
Vorlauf	100nM SLIGRL	Midazolam 10µM	n=6

Nach zehnminütiger Vorlaufphase wurden je 6 Segmente für 20 min entweder mit Lösungsmittel (Tyrodelsg.), 100nM TRAP oder 100nM SLIGRL vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 10µM Midazolam. Nach Zugabe des Midazolams wurde die Peristaltik für weitere 60 min registriert.

### **Versuchsreihe 12 (Interaktion – synthetische Liganden – Fentanyl)**

Zeitintervalle

<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>je 60 min</u>	
Vorlauf	Tyrodelsg.	Fentanyl 3nM	n=6
Vorlauf	100nM TRAP	Fentanyl 3nM	n=6
Vorlauf	100nM SLIGRL	Fentanyl 3nM	n=6

Nach zehnminütiger Vorlaufphase wurden je 6 Segmente für 20 min entweder mit Lösungsmittel (Tyrodelsg.), 100nM TRAP oder 100nM SLIGRL vorbehandelt. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 3nM Fentanyl. Nach Zugabe des Fentanyls wurde die Peristaltik für weitere 60 min registriert.

## 2.4. Auswertung

Die bereits beschriebene Druckschwelle zur Auslösung der Peristaltik PPT diene als Parameter für die Auslösbarkeit einer peristaltischen Kontraktion. Durch Applikation einer hemmenden Substanz steigt die PPT an, bis substanzabhängig trotz hoher intraluminaler Drücke keine peristaltischen Kontraktionen mehr ausgelöst werden können (Herbert et al. 2002a, 2002b). Eine Abnahme der PPT führt zur Stimulation der Peristaltik, d.h. der zur Auslösung einer peristaltischen Kontraktion notwendige Schwellendruck wird bereits bei einem geringeren Füllungsgrad des Darms erreicht. Somit diene die Veränderung der PPT der Quantifizierung der Wirkung einer Testsubstanz auf die Peristaltik (Costall et al. 1993, Holzer et al. 1994). Der Abstand der jeweiligen PPT zur Grundlinie (Abb.7) wurde in Millimeter ausgemessen und anschließend mittels der Kalibrierung in Pascal (Pa) umgerechnet. Als Referenzwert diene der Mittelwert der PPT der ersten und fünften Kontraktion vor Zugabe einer Substanz. Zur Datenreduktion wurde die jeweils letzte Kontraktion eines fünf Minuten Intervalls zur Auswertung herangezogen. Zur Berechnung der substanzspezifischen Veränderungen der PPT wurde der Referenzwert vom jeweiligen Fünfminuten-PPT-Wert abgezogen.

Eine komplette Hemmung der peristaltischen Kontraktionen zeigte sich durch einen kontinuierlichen intraluminalen Druckanstieg auf 400 Pa (Abb.6). Die Darmsegmente sind in diesem Fall maximal dilatiert.

Das erneute Einsetzen peristaltischer Aktivität nach kompletter Hemmung zeigt unterschiedliche Ausprägungen (Abb.8). Sogenannte Spontanaktivität ist durch eine intraluminale Druckänderung von mindestens einem Drittel von 400 Pa ( $\geq 133$  Pa) gekennzeichnet. Diese führte allerdings zu nur einem geringen und variablen Flüssigkeitsauswurf und war somit nicht mit einer geordneten Peristaltik vergleichbar. Eine erneute geordnete Peristaltik lag dann vor, wenn die PPT erneuter peristaltischer Kontraktionen maximal 20 Pa von der PPT im Vorlauf abwich.

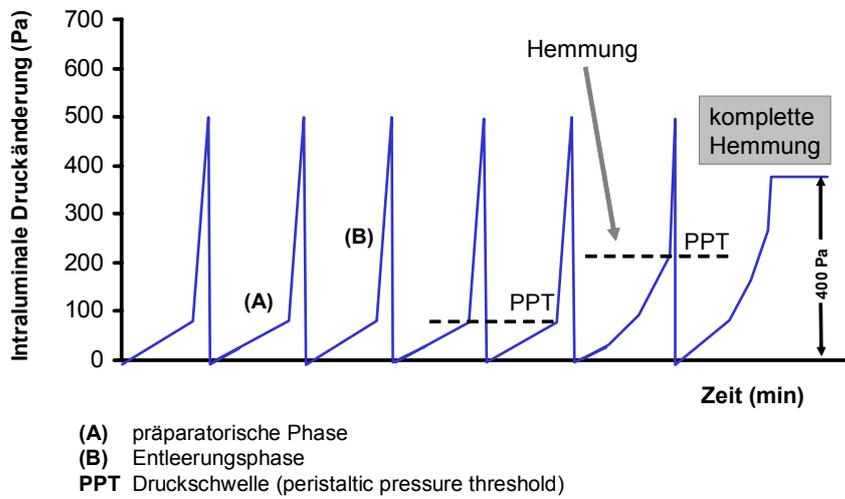


Abb.6: Darstellung eines PPT-Anstiegs bis zur kompletten Hemmung

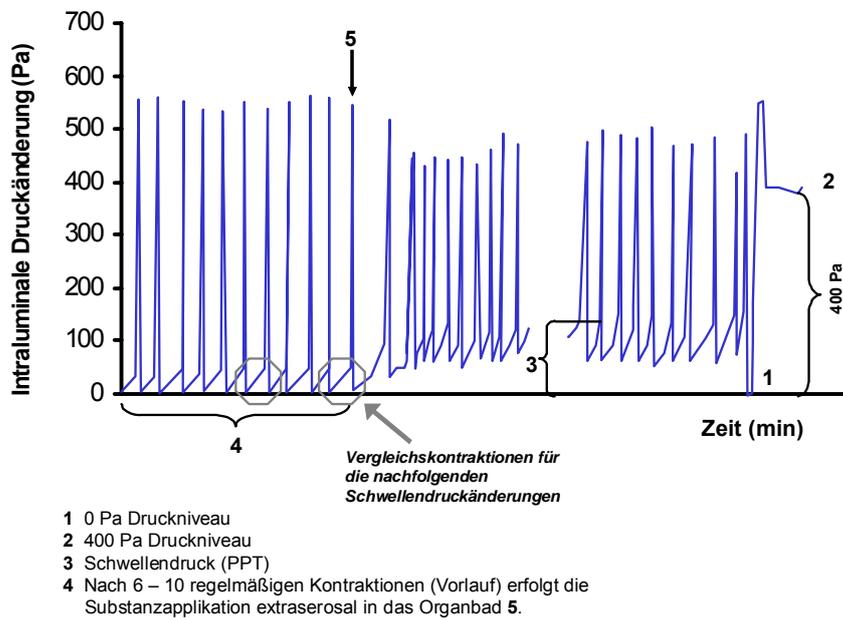


Abb.7: Darstellung der Auswertungskriterien

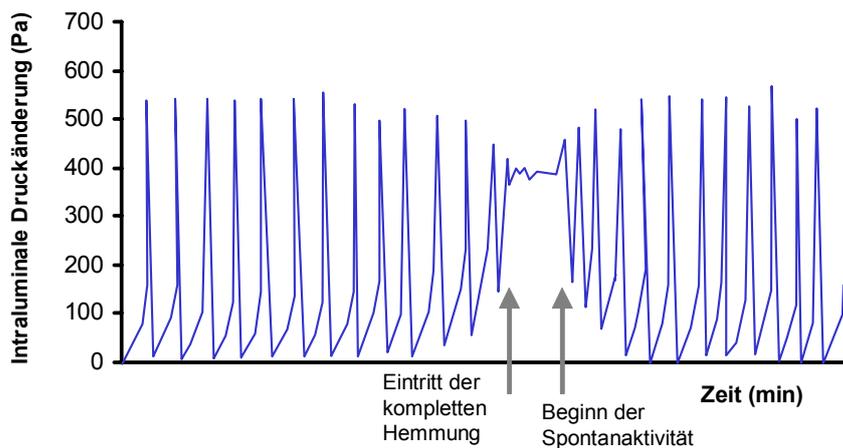


Abb.8: Schematische Darstellung einer kompletten Hemmung mit anschließender Rückkehr der Peristaltik

## 2.5. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde die PPT der letzten vollständigen Kontraktion eines Fünfminutenintervalls herangezogen. Von den PPT-Werten nach Zugabe einer Testsubstanz wurde jeweils der Mittelwert aus der PPT der letzten und fünftletzten Kontraktion vor Substanzzugabe abgezogen ( $\Delta PPT_1$ ).

Bei Versuchsreihen mit zwei Substanzgaben wurde die Wirkung der zweiten Substanz gegen die der ersten Substanz mit der  $\Delta PPT_2$  abgegrenzt.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Sigmastat 32 (Fa. SPSS Inc. Erkrath), dem Programm Excel, Version 2003 der Firma Microsoft und XLSTAT 2008 der Firma Addinsoft. Mittels des Kolmogoroff-Smirnow Test wurden die PPT-Werte auf Normalverteilung geprüft. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM, standard error of the mean) in Graphiken dargestellt. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte bei multiplen Vergleichen mittels ANOVA (analysis of variance) und post hoc Student-Newman-Keuls-Test. Der Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem Student-t-Test auf dem Signifikanzniveau  $p < 0.05$  durchgeführt.

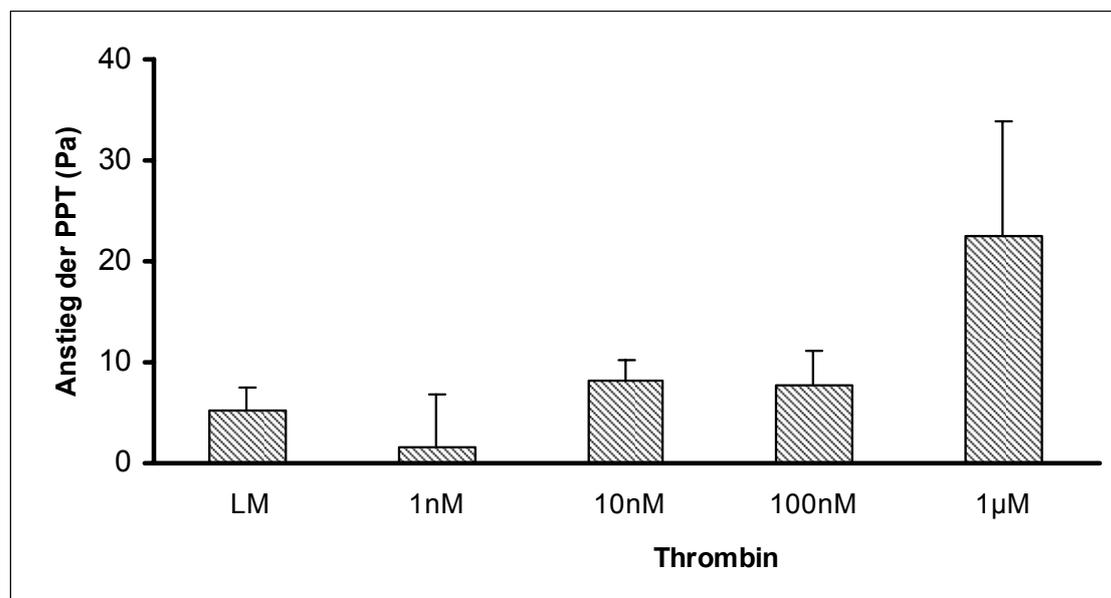
Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwertskurven oder Balkendiagrammen mit dazugehörigem Standardfehler (Excel und Powerpoint der Firma Microsoft Version 2003).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Wirkung physiologischer Liganden an PAR

Zur Beurteilung eines möglichen Einflusses von PAR auf die peristaltische Aktivität des Darms erfolgte zunächst eine Applikation von endogenen Aktivatoren der Rezeptoren. Hierzu wurde als Ligand für PAR1 Thrombin und für PAR2 das Trypsin verwendet.

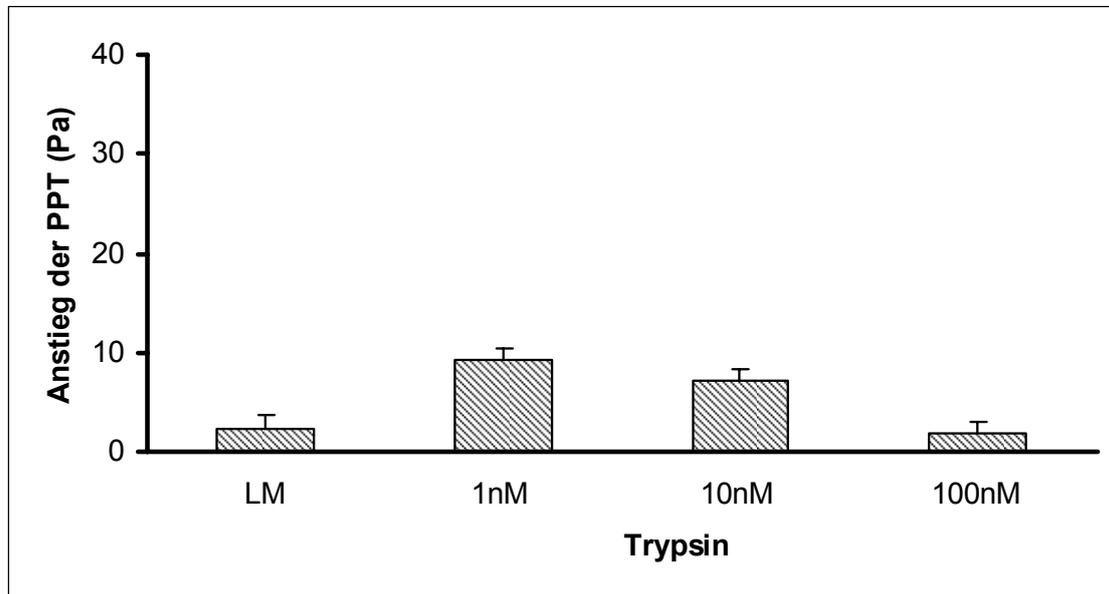
##### 3.1.1. Versuchsreihe 1: Thrombin Konzentrations-Wirkungs-Beziehung



**Abb. 9:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von Thrombin in Konzentrationen von 1nM-10nM-100nM-1µM im Vergleich zum Lösungsmittel (LM) . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten.

In Konzentrationen von 1nM bis 100 nM hatte Thrombin keinen Einfluss auf die Peristaltik. Erst bei einer Konzentration von 1µM konnte ein geringer, aber nicht signifikanter Anstieg der  $\Delta$  PPT verzeichnet werden.

### 3.1.2. Versuchsreihe 2: Trypsin Konzentrations-Wirkungs-Beziehung



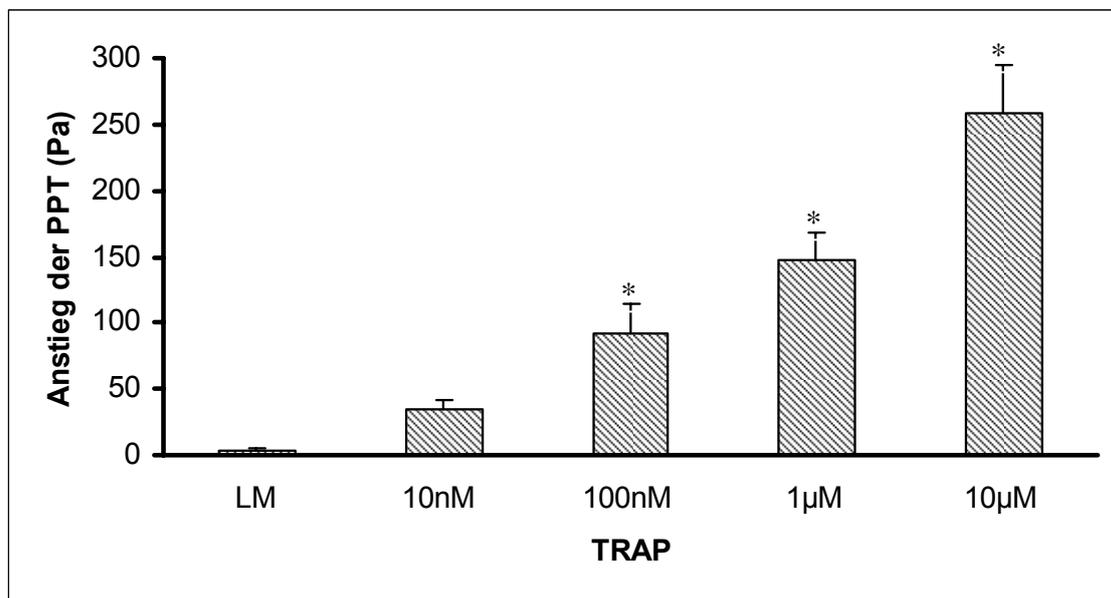
**Abb. 10:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von Trypsin in Konzentrationen von 1nM-10nM-100nM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten.

Durch Applikation von Trypsin in Konzentrationen von 1nM bis 100nM konnte gegenüber dem Lösungsmittel kein Effekt auf die peristaltische Aktivität nachgewiesen werden.

### 3.2. Wirkung synthetisch hergestellter Liganden an PAR

Da endogene Liganden an PAR keinen Effekt auf die peristaltische Aktivität zeigten, wurden in einer weiteren Versuchsreihe synthetisch hergestellte Liganden getestet (Ligand an PAR1: TRAP, Ligand an PAR2: SLIGRL).

#### 3.2.1. Versuchsreihe 3: TRAP Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

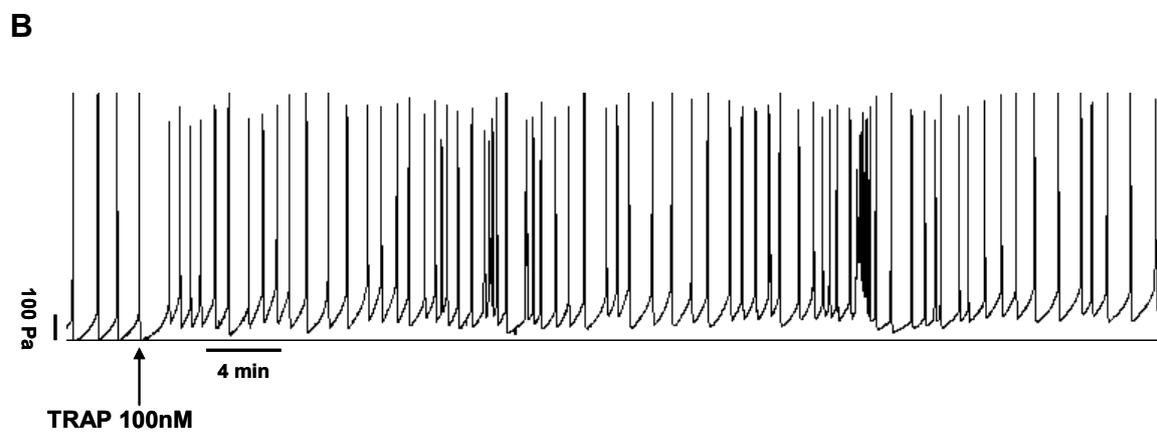
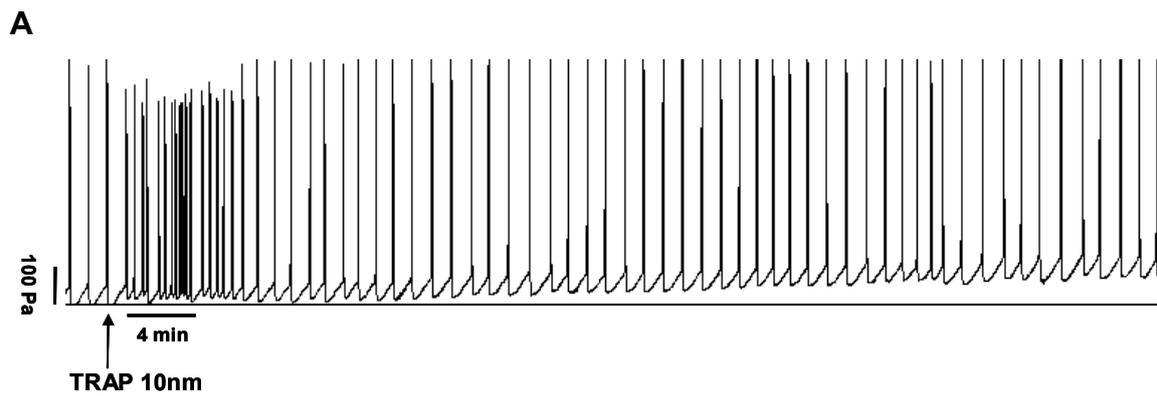


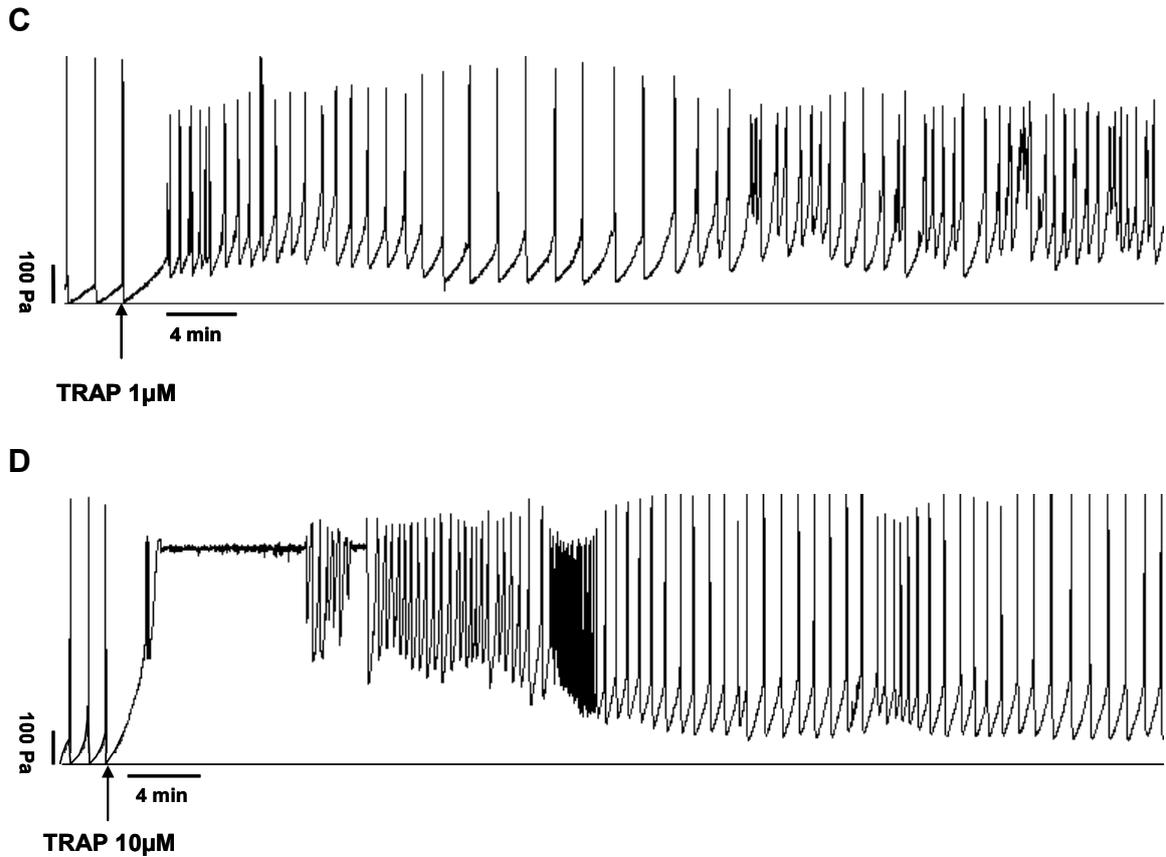
**Abb. 11:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von TRAP in Konzentrationen von 10nM-100nM-1µM-10µM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten. Statistisch signifikante Veränderungen sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0.05$ ).

TRAP verursacht im Gegensatz zum Lösungsmittel einen konzentrationsabhängigen Anstieg der PPT. Nach Zugabe von 10nM TRAP betrug die PPT-Zunahme im Mittel  $34,3 \pm 7,5$  Pa. Die Konzentration von 1µM führte bei drei der sechs Segmente zu einer vorübergehenden Hemmung mit anschließendem Recovery. Die höchste Konzentration von 10µM induzierte bei zwei der sechs Segmente eine komplette Hemmung ohne erneutes Auftreten von Spontanaktivität, bei den übrigen vier Segmenten eine vorübergehende Hemmung. Hierbei lag die PPT im Mittel bei  $259,1 \pm 35,9$  Pa.

Die Veränderungen der mittleren PPT in Konzentrationen von 100nM, 1µM und 10µM waren von der Kontrolle (Lösungsmittel) signifikant verschieden.

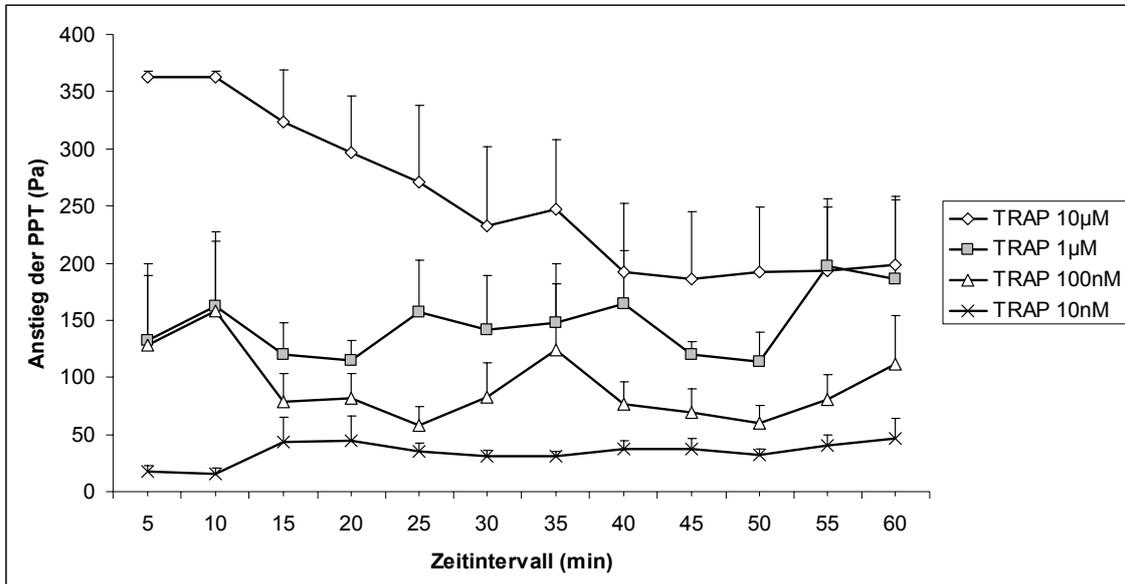
### 3.2.2. Versuchsreihe 3: TRAP: Originalregistrierungen





**Abb. 12:** Originalregistrierungen der intraluminalen Druckänderungen peristaltischer Kontraktionen unter der Wirkung von TRAP. Nach gleichmäßigen Kontraktionen erfolgt die Zugabe (Pfeil) von TRAP 10nM (A), 100nM (B), 1 $\mu$ M (C), und 10 $\mu$ M (D). Während 100nM und 1 $\mu$ M einen Anstieg der PPT bewirken (B, C) induziert die Konzentration von 10 $\mu$ M (D) eine vorübergehende Aufhebung der Peristaltik mit anschließendem Recovery.

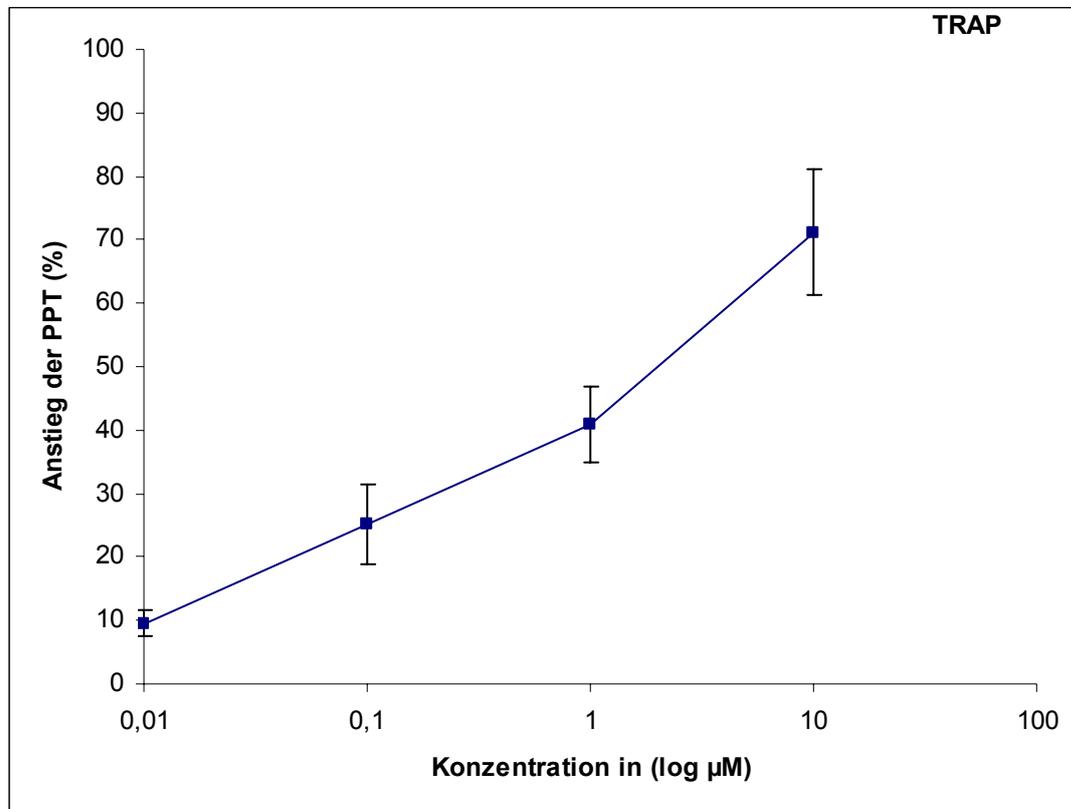
### 3.2.3. Versuchsreihe 3: TRAP Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Zeitverlauf)



**Abb. 13:** Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und Zeitverlauf des PPT Anstiegs über einen Zeitraum von 60 min. Der Beginn der Aufzeichnung entspricht der ersten Messung nach Substanzapplikation. Gekennzeichnet sind jeweils die Mittelwerte des PPT-Anstiegs mit dazugehörigem Standardfehler (SEM, standard error of the mean) aus jeweils sechs Segmenten. Sind keine Fehlerbalken sichtbar, so überdeckt das Symbol die Höhe des Standardfehlers. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in dieser Graphik nur die positiven Standardfehler eingezeichnet.

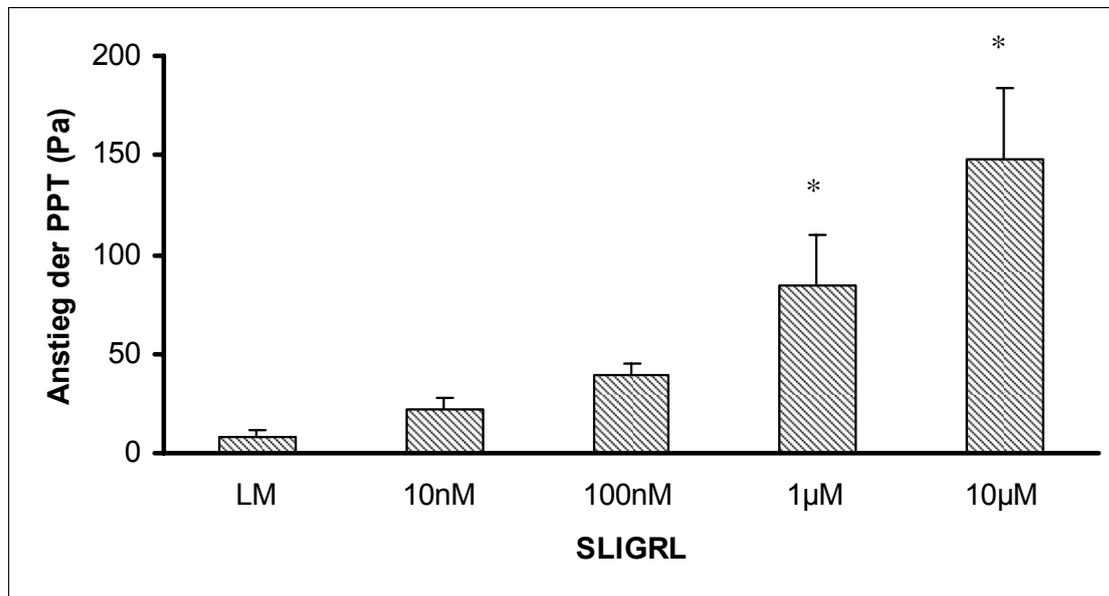
Innerhalb des Beobachtungszeitraums wird durch die niedrigste Konzentration der Testsubstanz TRAP kein modulierender Effekt auf die Dünndarmperistaltik beobachtet. Die höchste Konzentration von 10µm induziert besonders zu Beginn des Beobachtungszeitraums bzw. innerhalb der ersten 2 Messpunkte nach Substanzapplikation den stärksten Effekt mit einem maximalen PPT Anstieg bis zu 380 Pa.

### 3.2.4. Versuchsreihe 3: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des Anstiegs der PPT nach TRAP in (%) des maximal möglichen Anstiegs der PPT



**Abb. 14:** Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte des PPT-Anstiegs über den Messzeitraum von 60 min mit dazugehörigem Standardfehler (SEM, standard error of the mean) aus n=6 Segmenten.

### 3.2.5. Versuchsreihe 4: SLIGRL Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

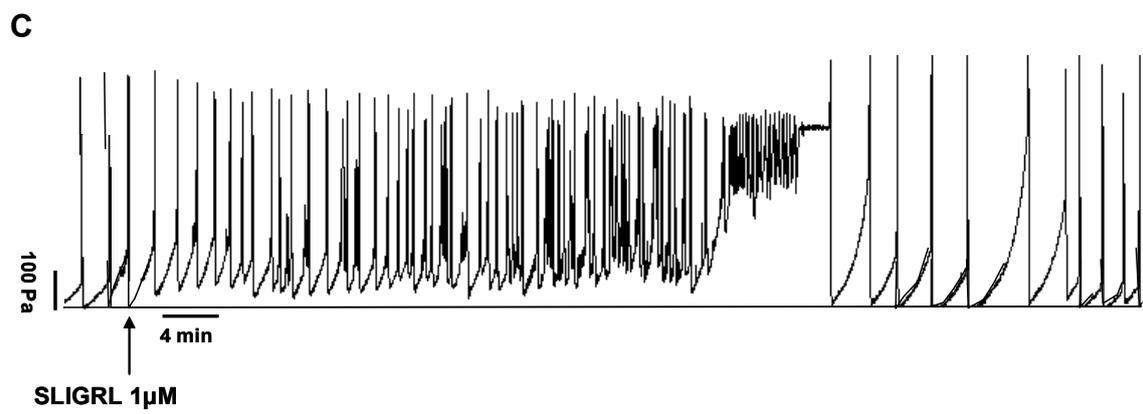
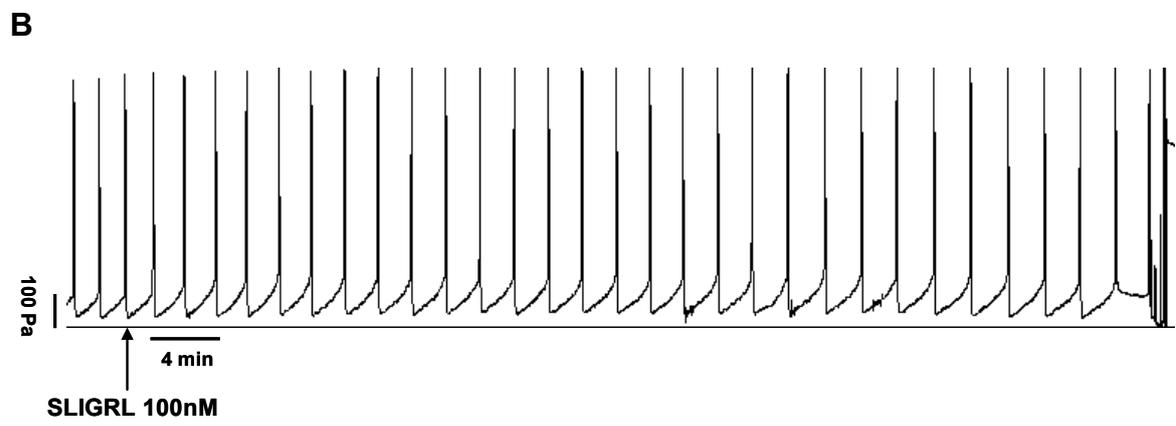
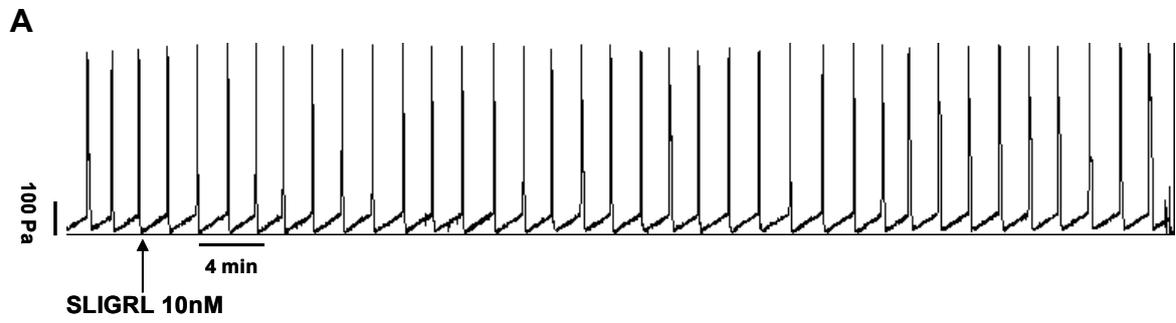


**Abb. 15:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von SLIGRL in Konzentrationen von 10nM-100nM-1µM-10µM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten. Statistisch signifikante Veränderungen sind mit \* gekennzeichnet. ( $p < 0.05$ ).

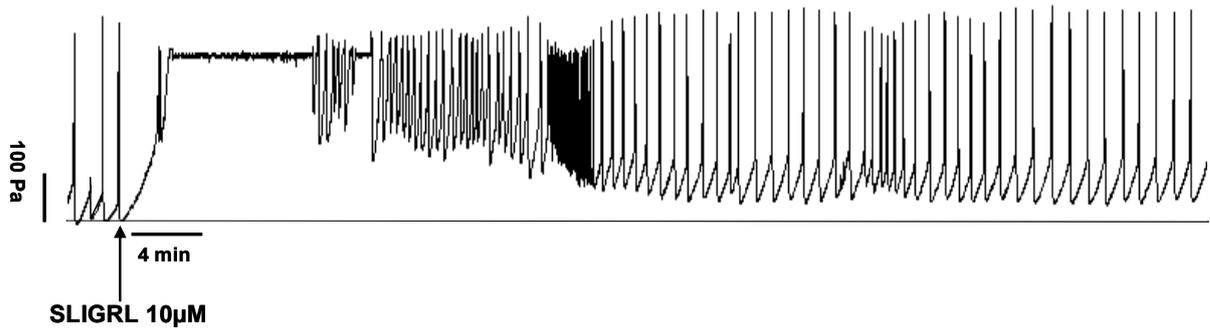
SLIGRL induzierte in Konzentrationen von 10nM bis 10µM einen Anstieg der mittleren PPT. Hierbei handelte es sich um einen dosisabhängigen Effekt. Die Zugabe von 1µM verursachte bei drei der sechs getesteten Segmente eine vorübergehende Hemmung. Die höchste Konzentration 10µM induzierte bei drei der sechs Segmente eine Hemmung mit anschließendem Recovery, bei einem Segment eine vollständige Hemmung. Die PPT betrug bei dieser Konzentration im Mittel  $148,2 \pm 35,2$  Pa.

Die Veränderungen der mittleren PPT waren im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Konzentrationen von 1 µM und 10µM statistisch signifikant.

### 3.2.6. Versuchsreihe 4: SLIGRL: Originalregistrierungen

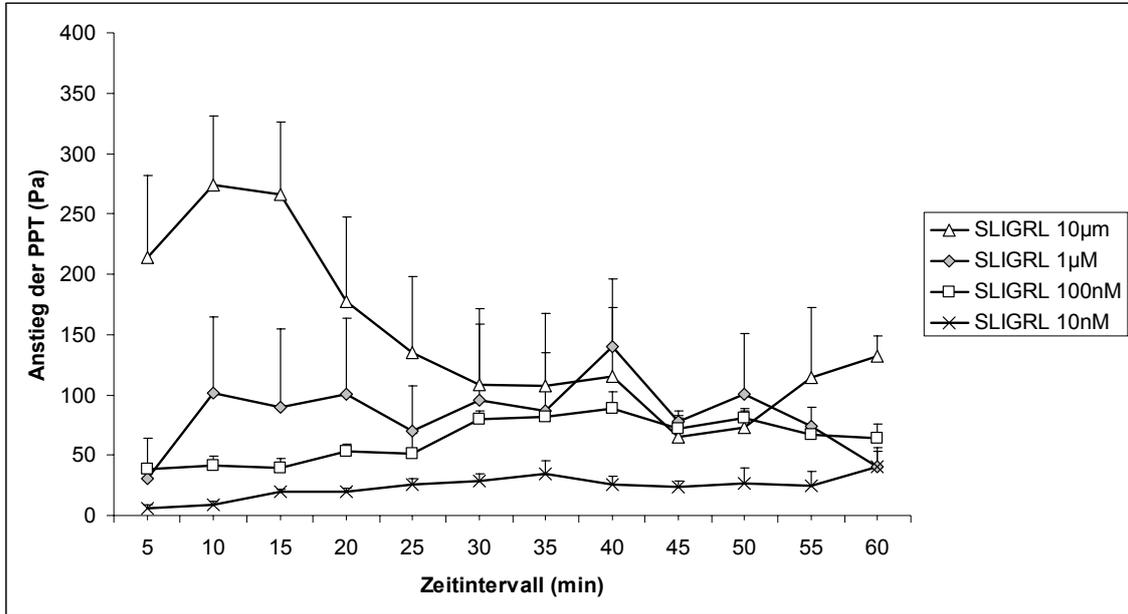


D



**Abb. 16:** Originalregistrierungen der intraluminaler Druckänderungen peristaltischer Kontraktionen unter der Wirkung von SLIRGL. Nach gleichmäßigen Kontraktionen erfolgt die Zugabe (Pfeil) von TRAP 10nM (A), 100nM (B), 1µM (C), und 10µM (D). Während 10nM und 100nM einen Anstieg der PPT verursachen (A, B), löst die Zugabe von 1µM eine ungeordnete Peristaltik mit kurzzeitiger kompletter Hemmung und anschließendem Recovery aus (C). Auch die höchste Konzentration von 10µM induziert eine Hemmung mit nachfolgender Rückkehr geordneter Peristaltik (D).

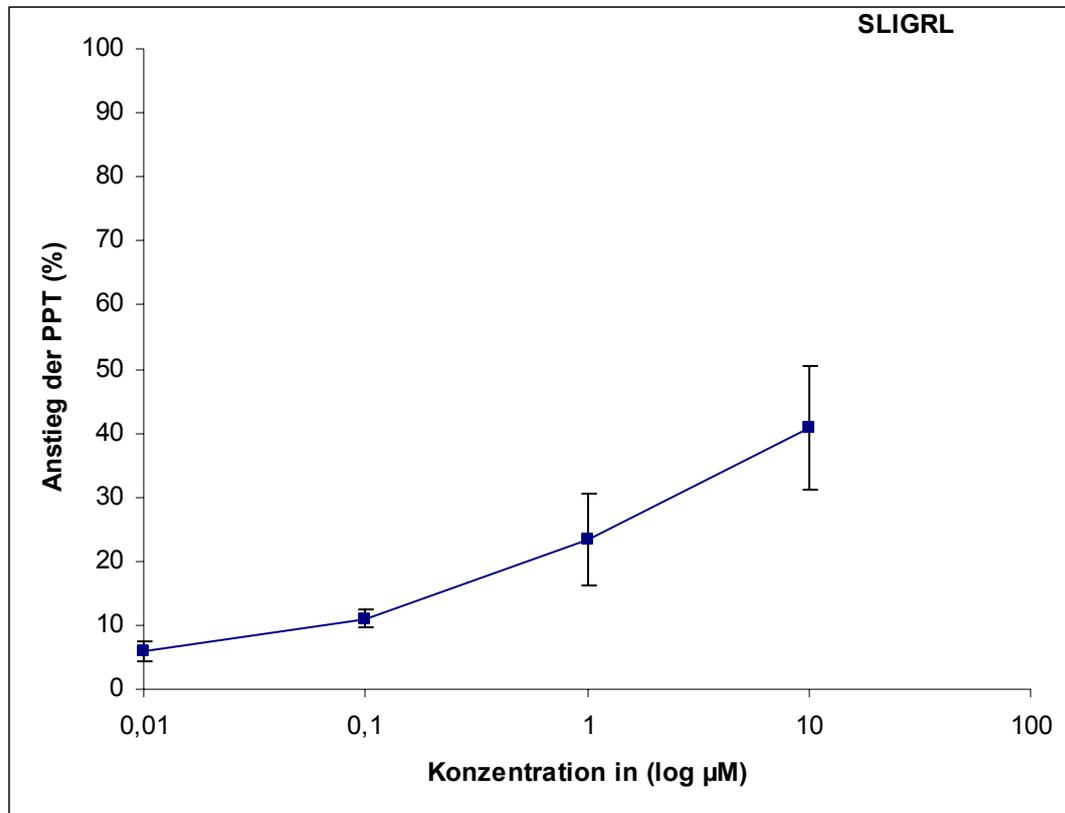
### 3.2.7. Versuchsreihe 4: SLIGRL Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Zeitverlauf)



**Abb. 17:** Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und Zeitverlauf des PPT Anstiegs über einen Zeitraum von 60 min. Der Beginn der Aufzeichnung entspricht der ersten Messung nach Substanzapplikation. Gekennzeichnet sind jeweils die Mittelwerte des PPT-Anstiegs mit dazugehörigem Standardfehler (SEM, standard error of the mean) aus jeweils sechs Segmenten. Sind keine Fehlerbalken sichtbar, so überdeckt das Symbol die Höhe des Standardfehlers. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der vorliegenden Graphik nur die positiven Standardfehler dargestellt.

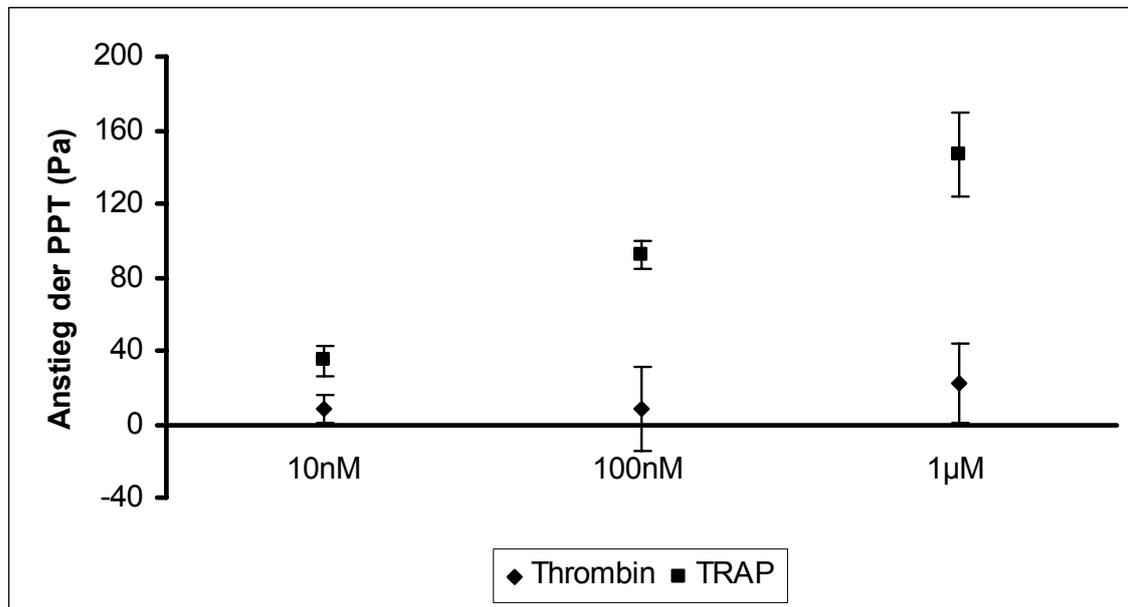
Innerhalb des Beobachtungszeitraums verursacht die niedrigste Dosis kaum Veränderungen der PPT. Die höchste Konzentration der Testsubstanz verursachte besonders zu Beginn des Testzeitraums (im 10 min und 15 min Intervall) die stärkste Hemmung der Peristaltik.

### 3.2.8. Versuchsreihe 4: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des Anstiegs der PPT nach SLIGRL in (%) des maximal möglichen Anstiegs der PPT



**Abb. 18:** Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte des PPT-Anstiegs über den Messzeitraum von 60 min mit dazugehörigem Standardfehler (SEM, standard error of the mean) aus n=6 Segmenten.

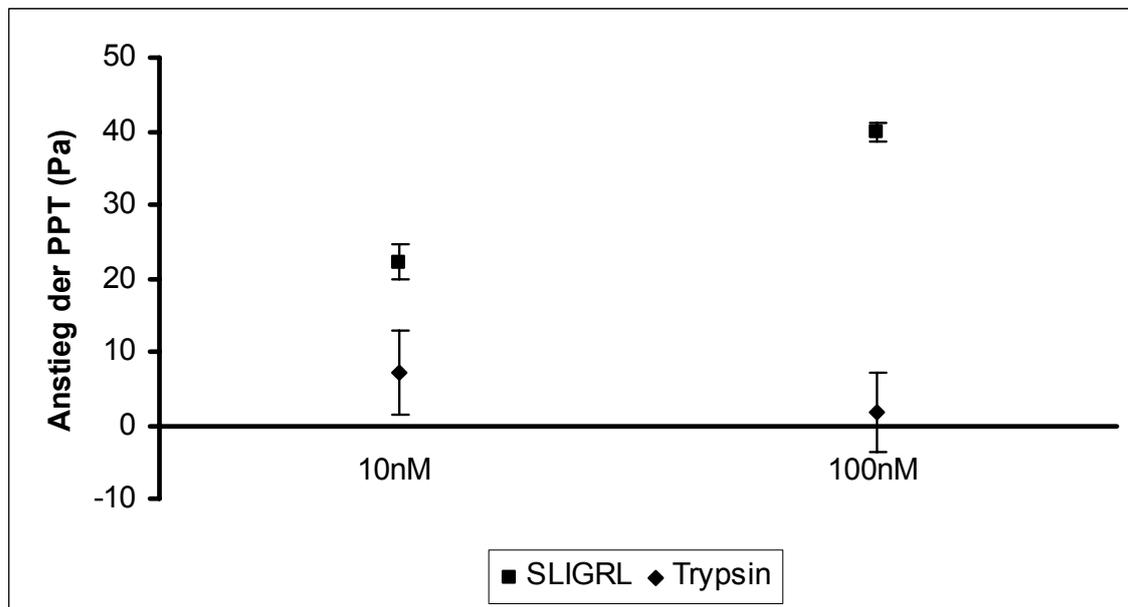
### 3.2.9: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Agonisten an PAR1



**Abb. 19:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von TRAP und Thrombin in Konzentrationen von 10nM-100nM-1µM. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten.

Vergleich der Wirkung eines endogenen (Thrombin) gegenüber synthetisch hergestellten Liganden (TRAP) an PAR1. Nach Zugabe des synthetischen Liganden konnte ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg des intraluminalen Schwellendrucks verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu hat Thrombin als endogener Ligand keinen Einfluss.

### 3.2.10.: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Agonisten an PAR2



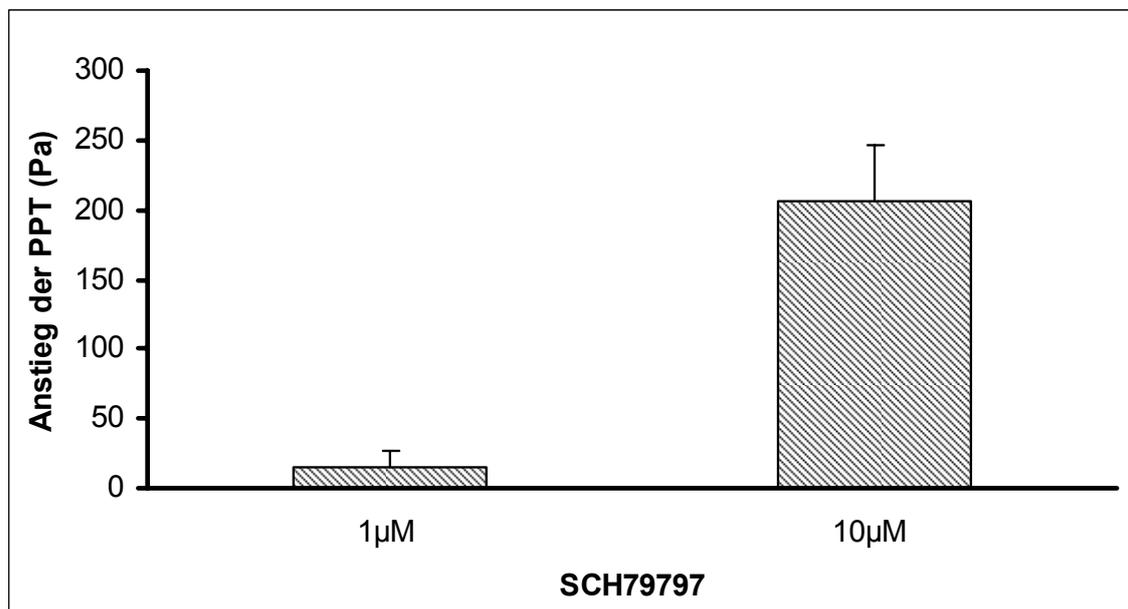
**Abb. 20:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von SLIGRL und Trypsin in Konzentrationen von 10nM und 100nM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten.

Obenstehendes Diagramm stellt die Wirkung des endogenen Liganden Trypsin dem synthetisch hergestellten Liganden SLIGRL an PAR2 gegenüber. Nach Zugabe des synthetischen Liganden trat ein deutlicher Anstieg des intraluminalen Schwellendrucks auf.

### 3.3. Untersuchungen zur Antagonisierung der Wirkung synthetisch hergestellter Liganden durch synthetisch hergestellte Antagonisten

#### 3.3.1. Versuchsreihe 5: SCH79797 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

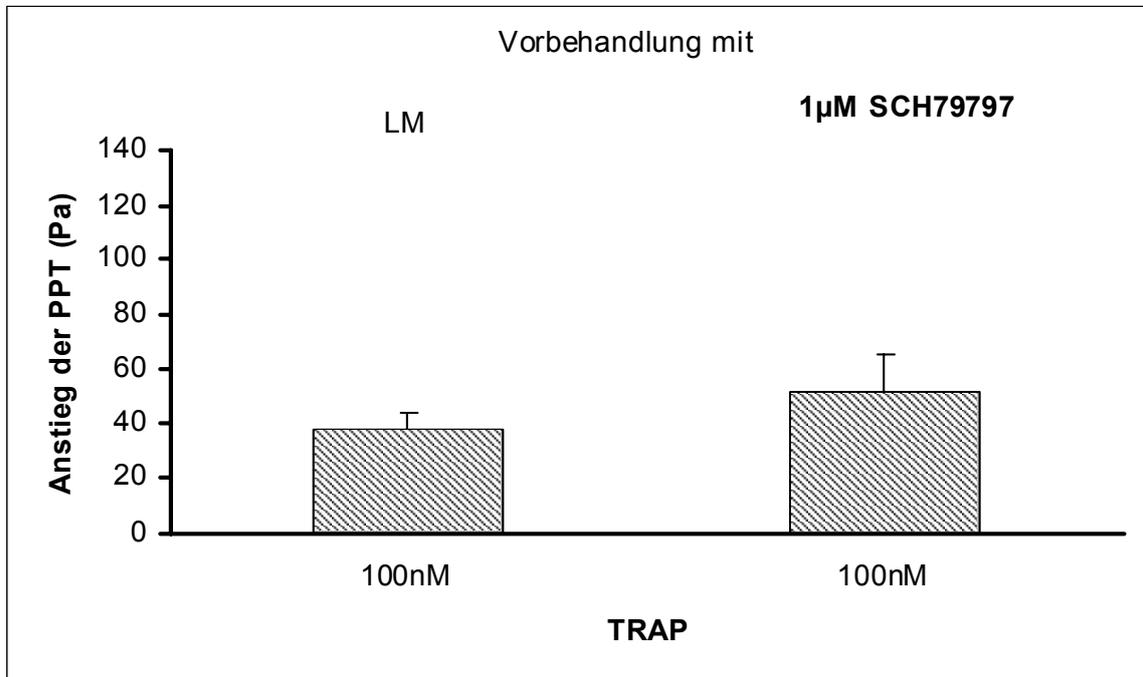
Zunächst erfolgte die Beurteilung der Eigenwirkung des Antagonisten auf die Peristaltik.



**Abb. 21:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von SCH79797 in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten.

Die Applikation von SCH79797 in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM verursachte einen dosisabhängigen Anstieg der PPT. Die Zugabe des Antagonisten in einer Dosis von 10 µM verursachte bei vier der sieben untersuchten Segmente eine komplette Hemmung ohne Recovery (n=7).

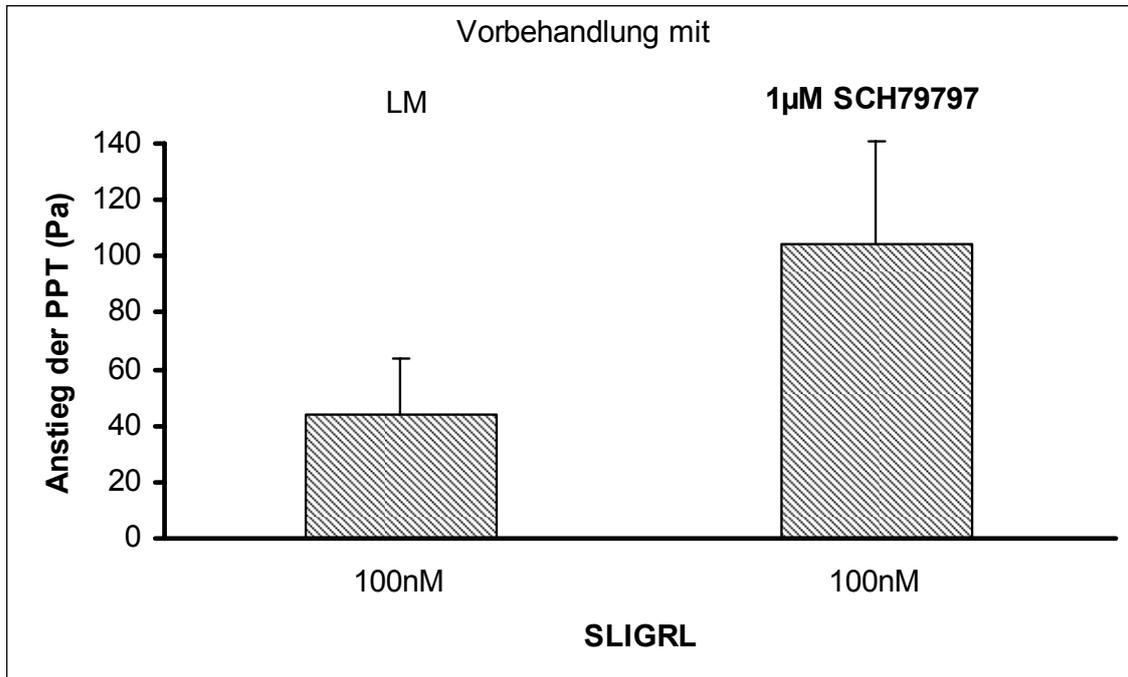
### 3.3.2. Versuchsreihe 6: SCH79797 – Interaktion mit TRAP



**Abb. 22:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von TRAP in einer Konzentration von 100nM nach Vorbehandlung mit Tyrodelösung und SCH79797 (1µM). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten nach Zugabe von TRAP.

Vor Zugabe von 100nM TRAP erfolgte eine Vorbehandlung der Segmente mit SCH79797 (1µM) oder zur Kontrolle mit Tyrodelösung. Die Vorbehandlung der Segmente mit dem Antagonisten SCH79797 (1µM) führte zu einem geringfügig verstärkten hemmenden Einfluss des synthetischen Liganden TRAP in einer Konzentration von 100nM im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3.3.3. Versuchsreihe 7: SCH79797 – Interaktion mit SLIGRL

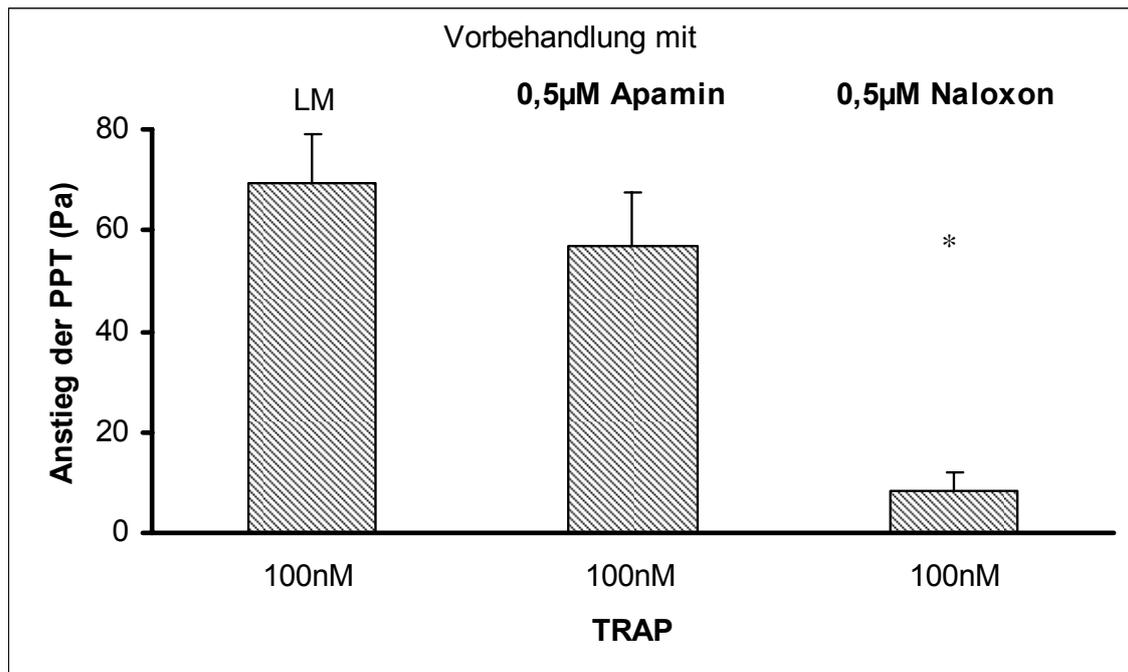


**Abb. 23:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von SLIGRL in Konzentrationen von 100 nM und 1 μM bei Vorbehandlung mit Tyrodelösung und SCH79797 (1 μM). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten nach Zugabe von SLIGRL.

Die Vorbehandlung der Darmsegmente mit SCH79797 (1 μM) vermindert nicht den durch SLIGRL ausgelösten hemmenden Effekt auf die PPT. Die hemmende Wirkung von SLIGRL (100nM) wurde sogar durch eine vorherige Applikation des Antagonisten verstärkt.

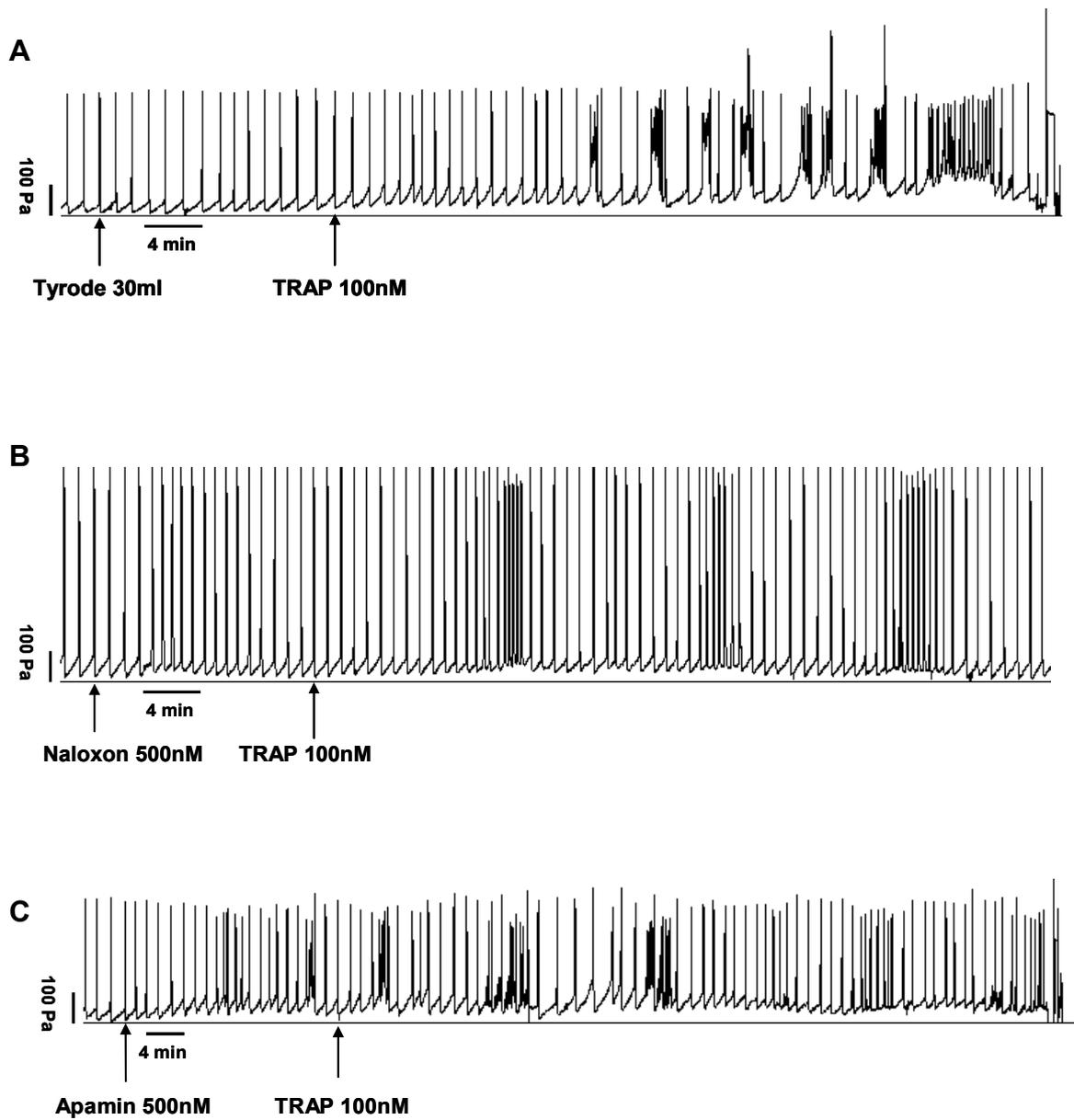
### 3.4. Untersuchungen zur Antagonisierung der Wirkung synthetisch hergestellter Liganden durch Apamin und Naloxon

#### 3.4.1. Versuchsreihe 8: TRAP – Antagonisierung der Wirkung durch Apamin und Naloxon



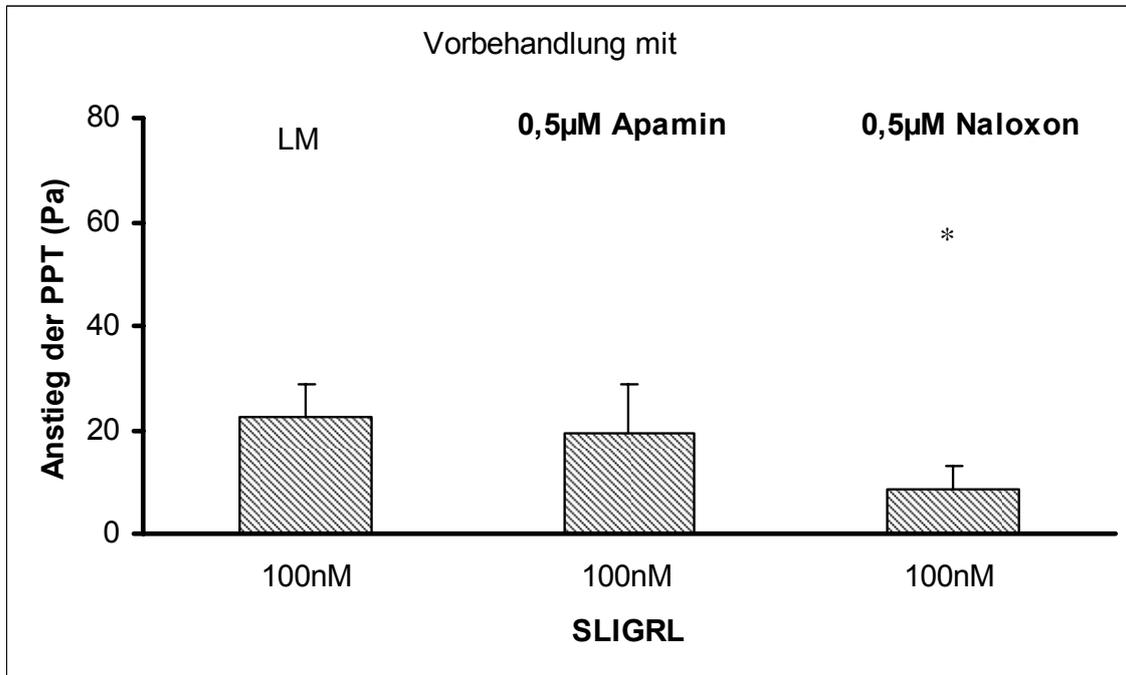
**Abb. 24:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von TRAP in Konzentrationen von 100nM bei Vorbehandlung mit 0,5µM Apamin, 0,5µM Naloxon und Tyrodelösung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten nach Zugabe von TRAP. Statistisch signifikante Veränderungen sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0.05$ ).

Eine vorherige Applikation von 0,5µM Apamin führt zu einer geringen Verminderung der durch TRAP ausgelösten hemmenden Wirkung auf die Peristaltik. Hierbei handelt es sich jedoch um einen nicht statistisch signifikanten Effekt. Im Gegensatz hierzu induziert die Vorbehandlung mit 0,5µM Naloxon eine statistisch signifikante Reduktion der durch TRAP ausgelösten Hemmung des Dünndarms. Der PPT-Anstieg konnte gegenüber der Kontrollgruppe (Vorbehandlung mit Tyrodelsg.) um 88% reduziert werden.



**Abb. 25:** Originalregistrierungen der intraluminalen Druckänderungen peristaltischer Kontraktionen unter der Wirkung von 100nM TRAP, nach Vorbehandlung des Darms mit Tyrodelösung (A), Naloxon 500nM (B) und Apamin 500nM (C). Der Zeitpunkt der jeweiligen Substanzapplikation ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

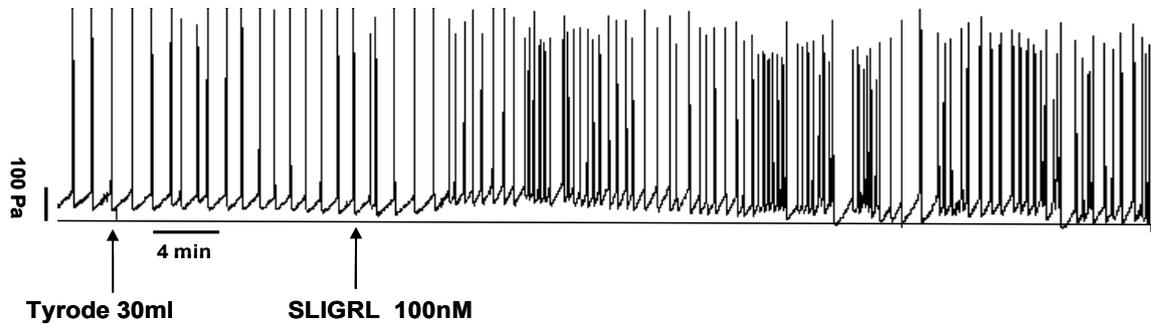
### 3.4.2. Versuchsreihe 9: SLIGRL – Antagonisierung der Wirkung durch Apamin und Naloxon



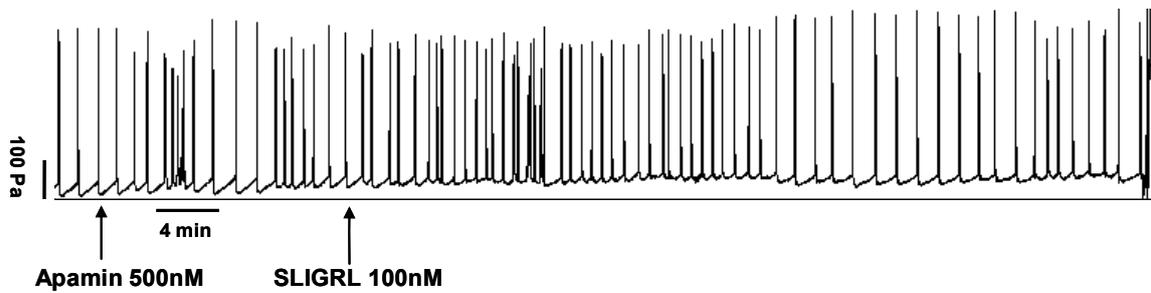
**Abb. 26:** Mittlere PPT in Pa nach Zugabe von SLIGRL in Konzentrationen von 100 nM bei Vorbehandlung mit 0,5μM Apamin, 0,5μM Naloxon und Tyrodelösung. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM über den Meßzeitraum von 60 Minuten nach Zugabe von SLIGRL. Statistisch signifikante Veränderungen sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0.05$ ).

Die Vorbehandlung des Darms mit 0,5μM Apamin hat keinen Einfluss auf die durch SLIGRL induzierte Hemmung der Peristaltik. Die Vorweggabe von 0,5μM Naloxon führte zu einer Verminderung des durch SLIGRL ausgelösten Anstiegs der PPT. Gegenüber der Kontrollgruppe wurde der PPT-Anstieg durch Vorbehandlung des Darms mit Naloxon um 63% gesenkt werden. Diese durch Naloxon ausgelöste Reduktion der  $\Delta$ PPT war im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ( $p < 0.05$ ).

**A**



**B**



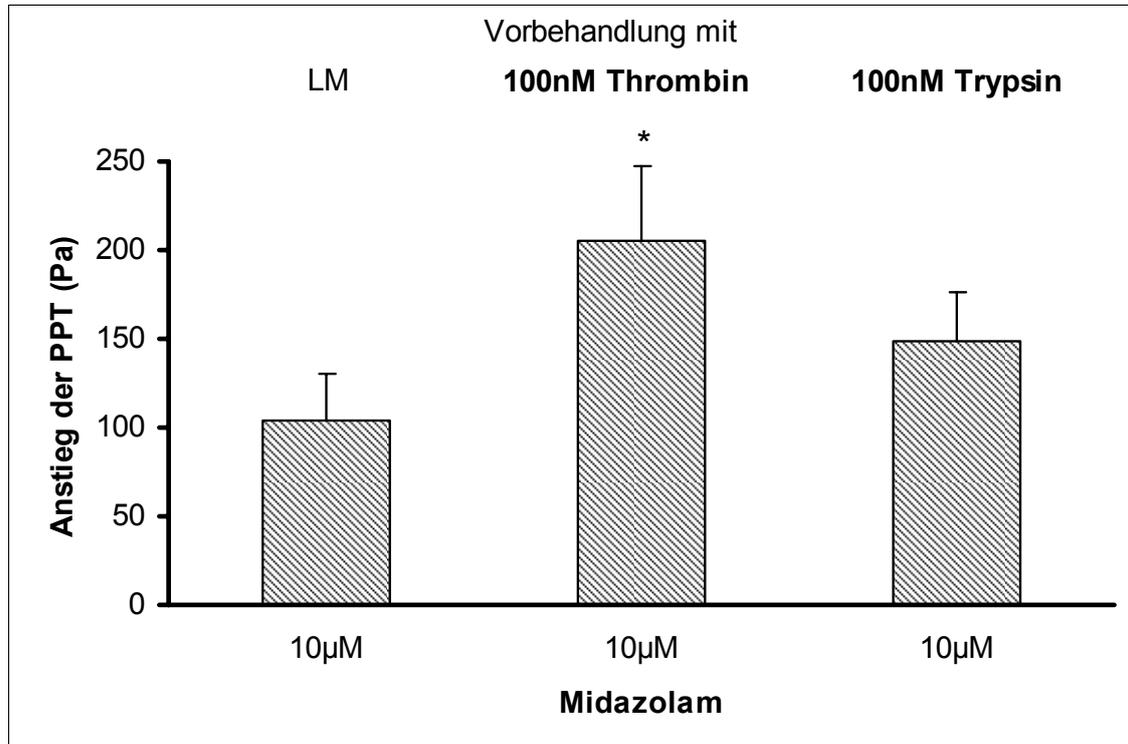
**C**



**Abb. 27:** Originalregistrierungen der intraluminalen Druckänderungen peristaltischer Kontraktionen unter der Wirkung von SLIGRL 100nM, nach Vorbehandlung des Darms mit Tyrodelösung (A), Naloxon 500nM (B) und Apamin 500nM (C). Der Zeitpunkt der jeweiligen Substanzapplikation ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

### 3.5. Interaktionen der Liganden an PAR1 und 2 mit Midazolam

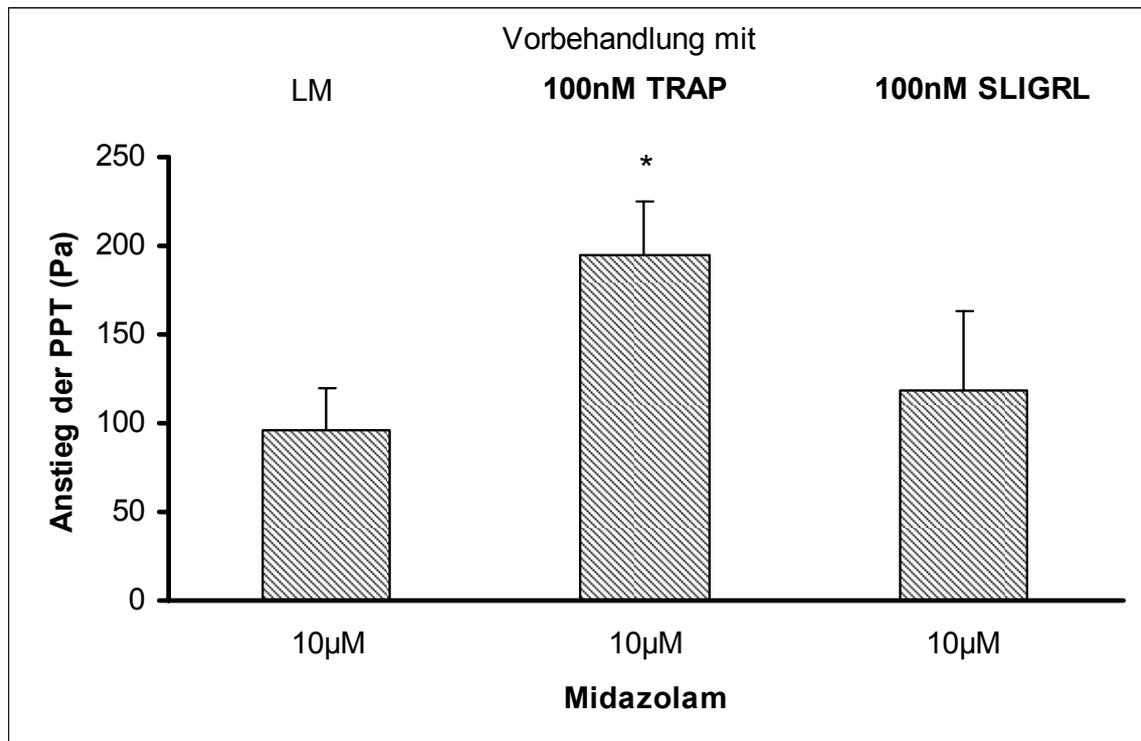
#### 3.5.1 Versuchsreihe 10: Interaktion – endogene Liganden – Midazolam



**Abb. 28:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von Midazolam in Konzentrationen von 10 µM bei Vorbehandlung mit Tyrodelösung, 100nM Thrombin und 100nM Trypsin. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM über einen Meßzeitraum von 60 Minuten nach Zugabe von Midazolam. Statistisch signifikante Veränderungen sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0.05$ ).

Zwanzig Minuten nach Vorbehandlung der Segmente mit 100nM Thrombin bzw. Trypsin erfolgte die Zugabe von 10µM Midazolam. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tyrodelsg.) wurde die hemmende Wirkung von Midazolam nach Vorbehandlung mit Thrombin verstärkt. Dieser Effekt ist statistisch signifikant. Hierbei wurden bei zwei Segmenten rezidivierende Hemmungen nach Substanzzugabe beobachtet, bei weiteren zwei Segmenten kurzfristige Hemmungen mit anschließender Rückkehr der Peristaltik. Die Vorbehandlung mittels Trypsin induzierte nur einen geringen Anstieg der PPT.

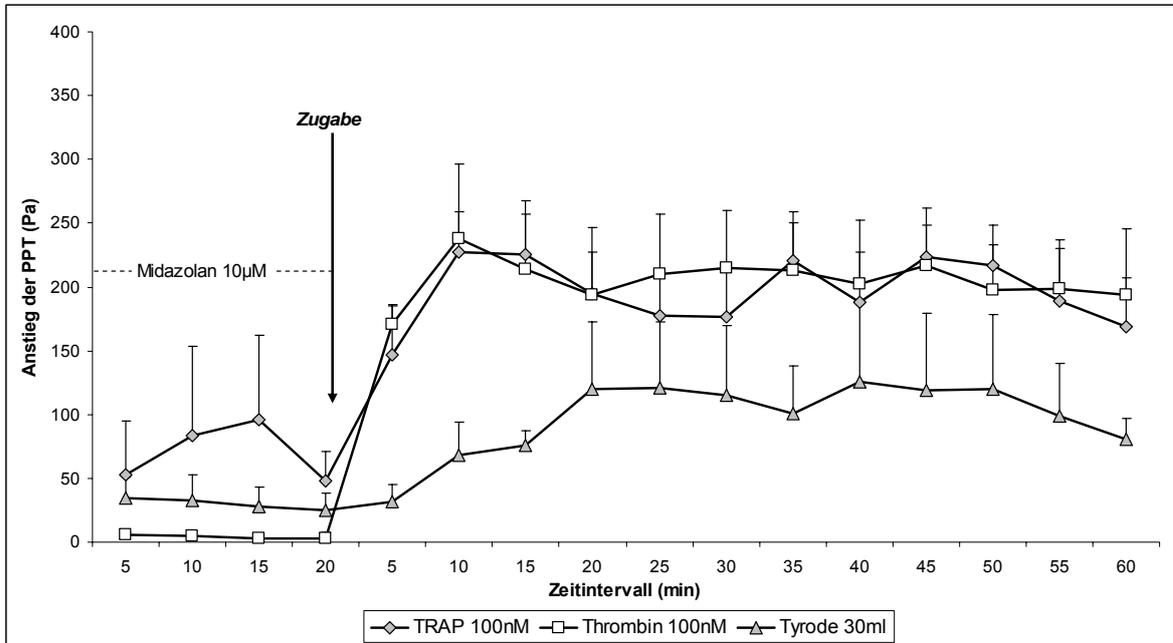
### 3.5.2 Versuchsreihe 11: Interaktion – synthetische Liganden – Midazolam



**Abb. 29:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von Midazolam in Konzentrationen von 10 µM bei Vorbehandlung mit Tyrodelösung, 100nM TRAP und 100nM SLIGRL. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über einen Meßzeitraum von 60 Minuten nach Zugabe von Midazolam. Statistisch signifikante Veränderungen sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0.05$ ).

Nach Vorbehandlung der Segmente mit 100nM TRAP bzw. SLIGRL erfolgte die Zugabe von 10µM Midazolam. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führt die Zugabe von Midazolam nach Vorbehandlung durch SLIGRL zu keiner signifikanten Veränderung des Schwellendrucks. Die Vorbehandlung durch TRAP führte zu einem statistisch signifikanten Anstieg der PPT und somit zu einer Verstärkung der peristaltikhemmenden Wirkung von Midazolam. Hierbei wurden zwei der sechs Segmente vollständig gehemmt.

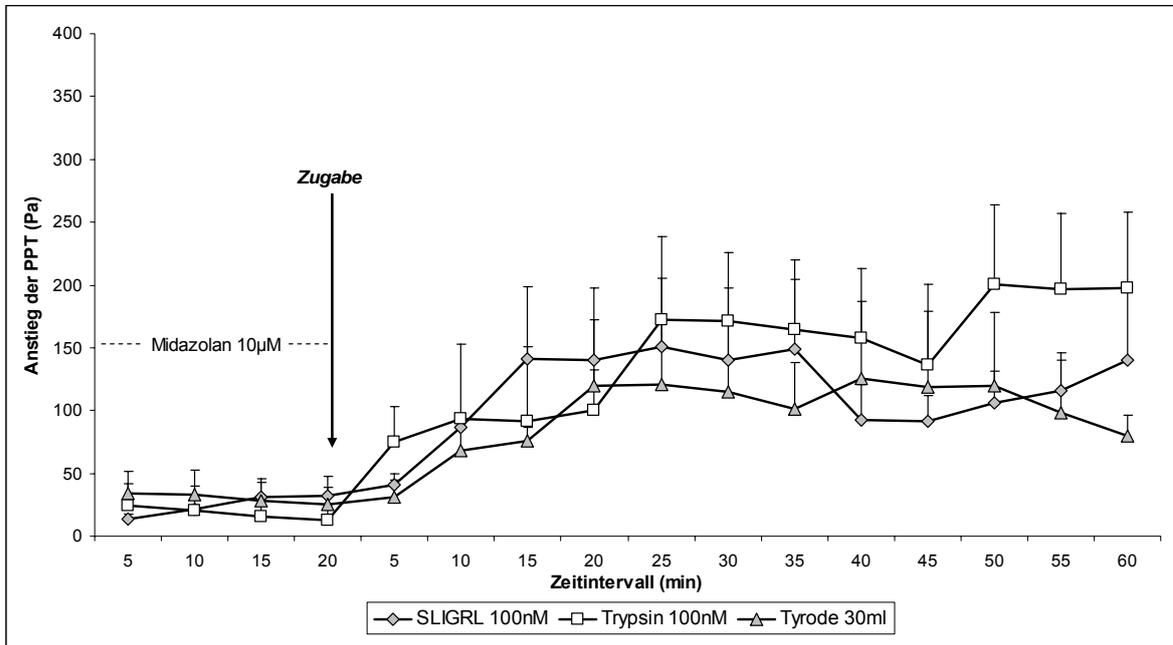
### 3.5.3. Versuchsreihe 11: Effekt von PAR-1 Liganden nach Vorbehandlung des Darms mit Midazolam



**Abb. 30:** Zeitverlauf des PPT Anstiegs über einen Zeitraum von 80 min. Der Beginn der Aufzeichnung entspricht der ersten Messung nach Applikation von 10µM Midazolam. Gekennzeichnet sind jeweils die Mittelwerte des PPT-Anstiegs mit dazugehörigem Standardfehler (SEM, standard error of the mean) aus jeweils sechs Segmenten. Sind keine Fehlerbalken sichtbar, so überdeckt das Symbol die Höhe des Standardfehlers. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der vorliegenden Graphik nur die positiven Standardfehler dargestellt.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Tyrodelsg.) kann nach Zugabe der PAR1-Agonisten TRAP und Thrombin in Konzentrationen von jeweils 100nM eine Verstärkung der durch Midazolam verursachten Hemmung beobachtet werden.

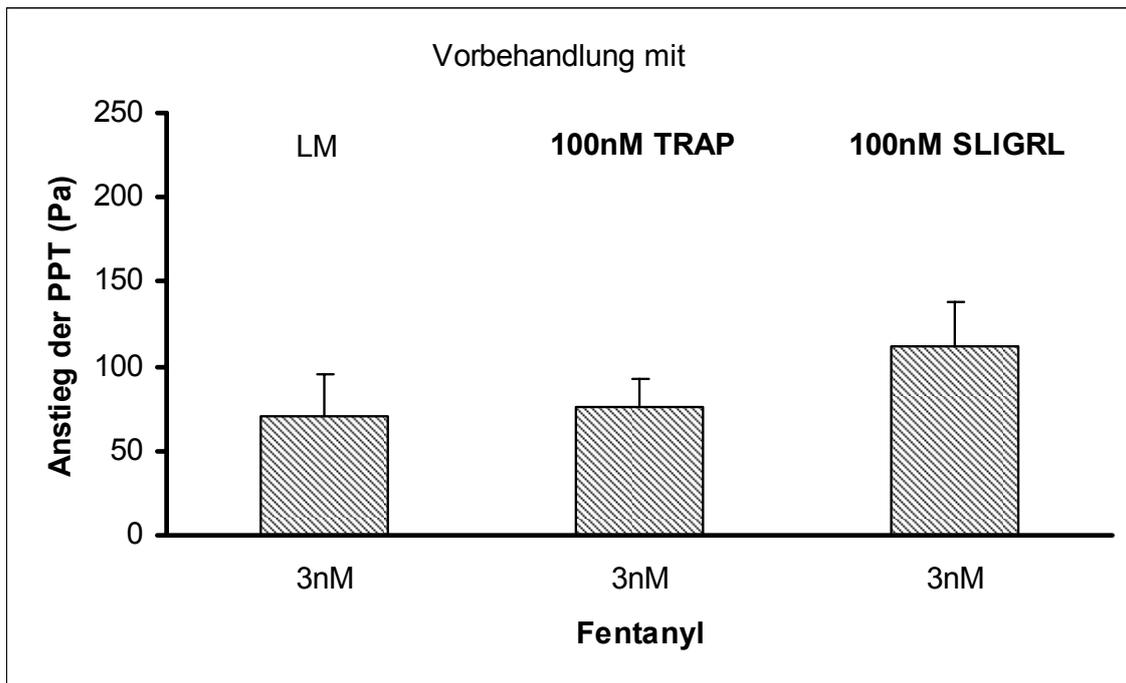
### 3.5.3. Versuchsreihe 11: Effekt von PAR-2 Liganden nach Vorbehandlung des Darms mit Midazolam



**Abb. 31:** Zeitverlauf des PPT Anstiegs über einen Zeitraum von 80 min. Der Beginn der Aufzeichnung entspricht der ersten Messung nach Applikation von 10µM Midazolam. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der vorliegenden Graphik nur die positiven Standardfehler dargestellt.

Die Zugabe der PAR-2 Agonisten verursacht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tyrodelsg.) keinen weiteren Anstieg der PPT.

### 3.6. Versuchsreihe 12: Interaktion – synthetische Liganden – Fentanyl



**Abb. 32:** Mittlerer Anstieg der PPT in Pa nach Zugabe von Fentanyl in einer Konzentration von 3nM bei Vorbehandlung mit Tyrodelösung, 100nM TRAP und 100nM SLIGRL. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM über einen Meßzeitraum von 60 Minuten nach Zugabe von Fentanyl.

Nach Vorbehandlung der Segmente mit 100nM TRAP bzw. 100nM SLIGRL erfolgte die Zugabe von 3nM Fentanyl. Die Vorbehandlung des Darms mit SLIGRL und TRAP beeinflusste nicht die Wirkung von Fentanyl auf die PPT.

#### 4. Diskussion

Die Ätiologie von Motilitätsstörungen des Darms ist multifaktoriell, wobei die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen bis heute nicht eindeutig geklärt sind. Anfang der 90ziger Jahre wurde eine erstmals beschriebene Klasse von Rezeptoren, die sog. PARs in zahlreichen Organen, u.a. im GI-Trakt nachgewiesen (Hollenberg et al 1993, 1992, Yang et al 1992, Vu et al 1991). Somit stellt sich die Frage, ob eine Aktivierung der PARs die Darmmotilität beeinflusst. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Wirkung dieser Rezeptoren auf die Peristaltik nach Aktivierung durch Agonisten bzw. Inaktivierung durch Antagonisten zu beschreiben. Um weitere Erkenntnisse über die Signalwege zu erlangen, wurden anschließend Interaktionen mit Agonisten und Antagonisten vermuteter Mediatoren untersucht.

Das in dieser Arbeit angewandte *in vitro* Perfusionsmodell hat sich bereits in vielen Untersuchungen bewährt (Herbert et al. 2007, 2005, 2002a, 2002b, Shahbazian et al. 2002a, 2002b, Holzer et al. 1995, 1998). Bereits 1917 zeigte Trendelenburg dass, bei intaktem ENS Peristaltik am isolierten Meerschweinchendünndarm durch Distension des Lumens ausgelöst werden kann (Hirst 1979, Kosterlitz et al. 1956). Die kontinuierliche Flüssigkeitsinfusion während der sog. Vorbereitungsphase führt zu einer Dehnung des Darms und löst hierdurch einen Akkommodationsreflex mit Erschlaffung des zirkulären Muskels sowie einen erregenden Reflex mit Kontraktion des longitudinalen Muskels aus. Bei einem für das jeweilige Darmsegment konstanten intraluminalen Schwellendruck (PPT) kommt es zur Auslösung einer peristaltischen Welle von oral nach aboral (Watermann et al. 1994a, 1994b). Zur Beurteilung der Wirkung des jeweiligen Pharmakons auf die Peristaltik wurde, wie in zahlreichen vorherigen Studien, die Veränderung dieses Schwellendrucks nach Applikation der Testsubstanz herangezogen (Heinemann et al. 1999a, 1999b, Barthò et al. 1995, Holzer et al. 1994, Costall et al. 1993). Die Zugabe einer properistaltischen Substanz führte zu einer Erniedrigung der PPT, die Zugabe einer inhibitorischen Substanz hingegen

zum konzentrationsabhängigen Anstieg. Bei vollständiger Hemmung des Darms war trotz eines intraluminalen Drucks über 400 Pa keine Peristaltik mehr auslösbar. Ein Anstieg der PPT repräsentiert somit eine herabgesetzte Sensitivität des Darms gegenüber der intraluminalen Flüssigkeit bzw. des hierdurch erhöhten Drucks (Herbert et al. 2005). Die Untersuchungen erfolgten deshalb am Ileum des Meerschweinchens, da dieses zahlreiche physiologische und pharmakologische Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Dünndarm aufweist (Herbert 2005).

Das hier genutzte, von Holzer und Maggi modifizierte Modell stellt ein univariates Experimentalkonzept nach dem „ceteris paribus – Prinzip“ dar. Hierbei dient die Substanzapplikation als Variable während alle anderen Prämissen, wie Oxygenierung, Badtemperatur oder Flussrate der kontinuierlichen Darmperfusion konstant bleiben. Nach Präparation hatte der Darm weder neuronale Verbindung zu übergeordneten Regulationszentren noch zu enterischen Gefäßen. Somit bietet das Modell die Möglichkeit Untersuchungen unabhängig vom extrinsischen Nervensystem sowie Änderungen der lokalen oder systemischen Durchblutung vorzunehmen. Infolgedessen beruhen alle durch Testsubstanzen ausgelösten Veränderungen der PPT ausschließlich auf enterischen Mechanismen. Während bei den klassischen *in vitro* Präparationen an isoliertem Quer- oder Längsmuskel des Darms nur Kontraktionsänderungen detektiert werden, kann im Rahmen dieser Versuchsanordnung eine koordiniert ablaufende Peristaltik mit effizientem Vorwärtstransport konstatiert werden (Herbert 2005). Der Effekt einer Substanz wird entweder durch neuronale Regelkreise und/oder primäre Sensitivitätsänderungen der intestinalen Schrittmacherzellen und/oder direkte Interferenz mit den Myozyten vermittelt, wobei der hier verwendete Versuchsaufbau eine weitergehende Differenzierung jedoch nicht zulässt (Sarna 2006, Hennig 2004, Hansen 2003, Holzer et al. 2003, Huizinga 1998, Holzer 1997).

Die in den *in vitro* Experimenten eingesetzten selektiven synthetischen Liganden TRAP und SLIGRL für PAR1 und PAR2 hemmen konzentrationsabhängig die Dünndarmmotilität. Die natürlichen Liganden Thrombin und Trypsin verursachten in den getesteten Konzentrationen am Dünndarm nahezu keinen Effekt. Dies verwundert zunächst, wäre aber durch mehrere Überlegungen und Befunde in der Literatur erklärbar. Eine Ursache für einen fehlenden Effekt könnte in einer geringeren Stabilität von Thrombin und Trypsin im Organbad liegen, obgleich es sich bei der Tyrodelösung um ein gepuffertes, physiologisches Medium handelt. Denkbar wäre auch, dass die extraserosale Zugabe der Substanzen zum Organbad und die somit erforderliche Permeation durch die Darmwandschichten die Aktivität der Substanzen vermindert. Von anderen Untersuchungen diverser Arbeitsgruppen ist aber eine derartige Einschränkung der Wirksamkeit von Testsubstanzen durch diesen Applikationsmodus bisher nicht beschrieben oder vermutet worden (Herbert et al 1999b, 2002a, 2002b, 2005, 2007, Holzer et al 1994, 1995, 1997, 1998, Shahbazian 2001, 2002a, 2002b).

Es gibt jedoch Hinweise aus Untersuchungen an anderen Präparationen, z.B. am Längsmuskel des Rattenduenodenum (Kawabata et al. 1999a), des Meerschweinchenmagens (Hollenberg et al. 1992) sowie an der Rattenaorta (Laniyonu et al. 1995), dass Thrombin eine geringer ausgeprägte Kontraktion und/oder Relaxation hervorruft als synthetische PAR1-APs. Ähnliche, wenn auch zum Teil widersprüchliche Befunde gibt es von Liganden an PAR2. Während in zahlreichen Studien Trypsin potenter als SLIGRL beschrieben wurde (Steinhoff et al. 2005, Corvera et al. 1997, Nystedt et al. 1994), zeigt eine Arbeit von Green et al. (2000), dass die Potenz von Trypsin im Ileum des Schweins zur Induktion von epithelalem Ionentransport nicht signifikant von der Potenz von SLIGRL verschieden ist. In isolierten Luftwegen der Ratte induzierte der synthetische PAR2-Agonist SLIGRL eine Relaxation, der endogene Ligand Trypsin hingegen keine Reaktion. Eine weitere Erklärung wäre, dass diese fehlende Reaktion auf einer Inhibition der Trypsinaktivität durch endogene Trypsininhibitoren beruht (Chow et al. 2000).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Trypsin und Thrombin in adäquaten Konzentrationen getestet wurden. Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Konzentrationen von Thrombin und Trypsin entsprechen den bekannten oder vermuteten physiologischen Konzentrationen oder entsprechen zumindest den Angaben in anderen *in vitro* Experimenten (Huang 2007, Kawabata et al 1999, 2000, Lee et al 2008, Gao et al 2002, Zhao et al 2003). So wird während der Nahrungsaufnahme bei Ratten eine luminale Trypsinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  gemessen (Ossovskaya et al. 2004, Kong et al. 1997), wobei während Pankreatiden deutliche höhere Konzentrationen auftreten können.

Das Spektrum der physiologischen bzw. pathophysiologischen Bedeutung von PARs erweitert sich zunehmend. Thrombin, der endogene Aktivator von PAR1, ist essentieller Bestandteil der Gerinnungskaskade und katalysiert die Bildung von unlöslichem Fibrin aus der löslichen Vorstufe Fibrinogen. Denkbar wäre, dass Thrombin bei gastrointestinalen Blutungen in höheren Mengen intraluminal vorkommt und so über eine Aktivierung von PARs zur Beeinträchtigung der Magen-Darm-Motilität führt. Trypsin, ein endogener Ligand von PAR2, kommt hauptsächlich als exokrines Enzym aus dem Pankreas, wurde aber auch in anderen extrapankreatischen Geweben, wie Endothelzellen oder Nervenzellen nachgewiesen. Somit könnte die Freisetzung des Enzyms aus diesen Zellen eine Wirkung auf die Magen-Darm-Tätigkeit zeigen (Nguyen et al. 1999). Der histochemische Nachweis von PAR in verschiedenen Strukturen des Magen-Darm-Trakts legt nahe, dass die endogenen Liganden durch die Aktivierung dieser Rezeptoren eine Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt entfalten.

Zahlreiche Studien bestätigen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit einen Effekt von PARs auf den Gastrointestinaltrakt. Andere Untersuchungen hingegen weisen in Abhängigkeit von der Lokalisation im Gastrointestinaltrakt sowie von der untersuchten Spezies widersprüchliche Befunde auf.

*In vitro* Kontraktionsmessungen an der intestinalen Längsmuskulatur der Ratte zeigen eine durch die Aktivierung von PAR1 ausgelöste Relaxation mit anschließender Kontraktion, PAR2 induzieren hingegen nur eine Kontraktion (Kawabata et al. 1999a). Die Wirkung von Trypsin variierte innerhalb der zitierten Studie mit der Präparation, wobei eine unterschiedliche Anzahl von PAR1 als Ursache für diese Variabilität vermutet wird. In niedrigen Konzentrationen wurde eine Kontraktion des gastrointestinalen Längsmuskels beobachtet, wie sie ebenfalls nach Zugabe des PAR2-Agonisten SLIGRL induziert wurde. In hohen Konzentrationen (0,08  $\mu$ M) wurde allerdings, wie nach Zugabe von PAR1-Agonisten eine duale Reaktion aus Kontraktion und Relaxation beobachtet, da Trypsin in dieser Konzentration als PAR2-Agonist offensichtlich auch zu einer schwach ausgeprägten Aktivierung von PAR1 fähig ist (Kawabata et al. 1999a).

Beim Meerschweinchen führte die Aktivierung beider Rezeptoren zu einer direkten Relaxation glatter Muskelzellen im Gastrointestinaltrakt (Cocks et al. 1999). Auch *in vitro*-Längsmuskel-Plexus-myentericus-Präparationen des Meerschweinchens bestätigen einen Effekt von PARs auf die Motilität. PAR2 induziert eine prolongierte Depolarisation der Neurone des Plexus myentericus (Linden et al. 2001). Untersuchungen von Gao und Kollegen (2002) zeigen, dass durch eine kontinuierliche Exposition von Trypsin, Thrombin und Tryptase eine anhaltende Aktivierung analwärts projizierender enterischer Neurone mit uniaxonaler Morphologie und elektrophysiologischem S-Typ-Verhalten induziert wird. Neuronen dieser Klassifikation wird eine inhibitorische Funktion auf den intestinalen zirkulären Muskel zugeschrieben (Gao et al. 2002). Die Stimulation von PAR2 durch SLIGRL führt in anästhesierten Ratten zu einem Anstieg des intrajejunalen Drucks sowie zu einer Erregung von extrinsischen afferenten Nerven (Kirkup et al. 2003). Dies ist ein weiterer Hinweis für eine neuronale Modulationsfähigkeit von PARs auf die Darmperistaltik, wobei die isolierte Betrachtung afferenter Nerven eine properistaltische Wirkung nahe legt.

Eine Beschleunigung des gastrointestinalen Transits durch PARs konnte bei Mäusen festgestellt werden. Diesen wurden nach intraperitonealer Injektion von Amastatin, einem Aminopeptidaseinhibitor, verschiedene PAR1- und PAR2-

Agonisten intraperitoneal injiziert und anschließend eine Kohlemahlzeit verabreicht (Kawabata et al. 2001). Bei der Interpretation dieser Experimente ist jedoch zu bedenken, dass es sich hier um *in vivo* Bedingungen handelt und beim Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowie den o.g. *in vitro* Studien zahlreiche weitere Einflussfaktoren zu berücksichtigen sind. Insgesamt ist zu konstatieren, dass PARs über diverse Mechanismen die geordnete Peristaltik, abhängig von der jeweiligen Spezies und der Lokalisation innerhalb des Magen-Darm-Traktes, beeinträchtigen können. Über den Einfluss der PARs auf die Darmmotilität beim Menschen liegen bislang noch keine Untersuchungen vor.

In separaten Versuchsreihen wurde der Frage nachgegangen, ob synthetische Antagonisten an PAR1 und PAR2 *per se* eine Wirkung auf die Dünndarmmotilität haben oder die motilitätshemmende Wirkung der selektiven Liganden aufheben können.

SCH79797 ist ein kompetitiver selektiver nichtpeptiderger Antagonist an PAR1 und blockiert beispielsweise die PAR1 vermittelte Calciummobilisation in hCASMC-Zellen (Ahn et al. 2000, Barry et al. 2006). Bei hCASMC-Zellen („human smooth muscle cells from coronary arteries“) handelt es sich um humane glatte Muskelzellen aus Herzkranzgefäßen (Ross 1993, Jonasson 1986). Demzufolge wäre es denkbar, dass SCH79797 auch die PAR1 vermittelte Hemmung der Dünndarmmotilität antagonisiert bzw. abschwächt. Die Applikation von TRAP in einer Konzentration von 100nM konnte durch 1µM SCH79797 nicht antagonisiert werden, sondern führte durch Verstärkung der antiperistaltischen Wirkung zu einer vollständigen Hemmung. Mögliche Ursache hierfür könnte eine mangelnde Selektivität von TRAP für PAR1 sein (Kawabata et al. 1999b, Hollenberg et al. 1997, Blackhart et al. 1996). Auch die motilitätshemmende Wirkung von 100nM SLIGRL wurde erwartungsgemäß nicht durch 1µM SCH79797 antagonisiert. Selektive Antagonisten an PAR2 konnten nicht untersucht werden, da falls überhaupt vorhanden, diese kommerziell nicht erhältlich waren.

Wie in der Einleitung geschildert, gibt es im Gastrointestinaltrakt mehrere inhibitorische Transmissionsmechanismen zwischen den Motoneuronen und glatten Muskelzellen. Die „nicht-adrenerge-nicht-cholinerge“ Hemmung wird durch Aktivierung von Apamin-sensitiven  $K^+$ -Kanäle vermittelt, die einen Anstieg von intrazellulärem Calcium bewirken und hierdurch eine langanhaltende Hyperpolarisation, sog. „slow afterhyperpolarisation“ induzieren. Durch diesen Mechanismus wird die Frequenz repetitiver Aktionspotentiale limitiert und die Zelle vor anhaltender tetanischer Aktivität geschützt (Vergara et al. 1998). Hierbei nutzt der apaminsensitive Mechanismus ATP oder andere Purine als Transmitter, der apamininsensitive Mechanismus hingegen VIP oder NO (Gharzouli et al. 2004, Watermann 1994b, Christ et al 1992). Beide Mechanismen induzieren auf diese Weise eine Hyperpolarisation und somit eine Unerregbarkeit der Zellmembran.

Nach Vorbehandlung des Darms mit 0,5  $\mu$ M Apamin erfolgte die Zugabe von TRAP oder SLIGRL in Konzentrationen von jeweils 100nM. Hierdurch konnte weder die inhibitorische Wirkung des PAR1- noch des PAR2-Agonisten reduziert werden. Somit scheinen an der hemmenden Wirkung der synthetischen PAR-Agonisten im Meerschweinchendünndarm keine „low conductance“  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanäle beteiligt zu sein. Im Gegensatz hierzu ist die PAR1 bzw. PAR2 induzierte Relaxation im Rattendünndarm (Kawabata 1999a), im Rattendickdarm (Mule et al. 2002), im Magenfundus der Maus (Cocks et al. 1999) und in den Meerschweinchen *Taenia coli* (Cocks et al. 1999) apaminsensitiv. Andererseits ist die PAR1 bzw. PAR2 vermittelte Relaxation im Rattendickdarm teilweise auch durch NO vermittelt (Mule et al. 2003). Im Dünndarm und Magenfundus der Maus (Zhao et al. 2003, Cocks et al. 1999) sowie im Duodenum der Ratte (Kawabata et al. 1999a) hingegen scheint die apamininsensitive Relaxation NO unabhängig zu sein. Der inhibitorische Effekt von Tetraethylammonium auf die PAR1 vermittelte Relaxation impliziert eine Beteiligung von anderen Kaliumkanälen als  $Ca^{2+}$ -abhängige  $K^+$ -Kanäle (Sekiguchi et al. 2006). Somit sind abhängig von der Tierspezies und der Lokalisation der PARs im Gastrointestinaltrakt apaminsensitive sowie apamininsensitive Mechanismen beteiligt. Im

Meerschweinchendünndarm hingegen scheinen apaminsensitive Mechanismen keine Rolle zu spielen.

Ein anderer inhibitorischer Mechanismus der motorischen Kontrolle im Gastrointestinaltrakt entfaltet seine Wirkung über opioidsensitive Neurone. Die Antagonisierbarkeit einer Substanzwirkung durch den Opioidantagonisten Naloxon belegt, dass die Substanz ihre Wirkung entweder über Opioidrezeptoren oder durch Aktivierung opioidsensitiver enterischer Neurone hervorruft. Die peristaltikhemmende Wirkung von TRAP und SLIGRL konnte durch Vorbehandlung des Darms mit Naloxon erheblich reduziert bzw. aufgehoben werden. Somit induzieren die beiden synthetischen Liganden an PAR1 und PAR2 eine möglicherweise substanzunspezifische Aktivierung enterischer opioidergener Neurone, die eine peristaltikhemmende Wirkung vermitteln. Weitere Nichtopioidepharmaka wie Clonidin, Dexmedetomidin, Midazolam sowie Barbiturate scheinen ebenfalls durch diesen Mechanismus eine motilitätshemmende Wirkung zu haben (Herbert et al. 2002b, Berg et al. 2001). Bei der Interpretation dieser Befunde ist zu bedenken, dass Endorphine physiologischerweise an der Regulation der intestinalen Motilität beteiligt sind und demzufolge die alleinige Blockade opioidergener Rezeptoren durch Naloxon bereits eine properistaltische Wirkung haben kann (Kraft 2007, Holzer 2004, Holzer et al. 1998, De Luca et al. 1996, Kromer et al. 1981). Ähnlich wie in den vorliegenden Untersuchungen konnte der stimulierende Effekt von Naloxon in isolierten Dünndarmsegmenten des Meerschweinchens durch den Abfall der PPT sowie einen Frequenzanstieg nachgewiesen werden (vgl. Shahbazian et al. 2002a). Weiterhin erhöhte die Applikation von Naloxon die elektrisch stimulierte Kontraktionsamplitude isolierter Dickdarmstreifen der Ratte (Liu et al. 2004). Auch Untersuchungen von Cosola et al. (2006) zeigen einen durch Naloxon induzierten signifikanten Anstieg der Kontraktionsamplitude sowie des Tonus im Jejunum des Kaninchens. Dieser Effekt ist allerdings ausschließlich im Konzentrationsbereich bis  $10^{-6}$  zu beobachten, höhere Konzentrationen führen zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen (Cosola et al. 2006). Bei Naloxon ist anzunehmen, dass die properistaltische Wirkung durch eine

erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration vermittelt wird. Zum einen werden intrazelluläre Speicher durch Aktivierung der Phospholipase C mobilisiert (Piros et al. 1996), zum anderen bindet es als Agonist an spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle (Tokuyama et al. 1996). Weiterhin steigern  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptorantagonisten die Freisetzung von Acetylcholin aus dem Plexus myentericus (Cosentino et al. 1995) und Naloxon steigert zusätzlich die Freisetzung von Substanz P (Holzer 2004, Donnerer et al. 1984). Acetylcholin und Substanz P sind bedeutende exzitatorische Transmitter des enterischen Nervensystems. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Aufhebung der durch die PAR-Liganden hervorgerufenen Hemmung der Darmmotilität hauptsächlich durch die properistaltische Eigenwirkung von Naloxon bedingt ist (Heinemann et al. 1999).

Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Peristaltik durch Pharmaka, die routinemäßig zur Behandlung von Intensivpatienten eingesetzt werden, z.B. das Benzodiazepin Midazolam und Opioid Fentanyl. Midazolam induziert in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  einen signifikanten Anstieg der PPT und hemmt die Peristaltik komplett bei  $100\mu\text{M}$  (Herbert et al. 1999b). Diese Inhibition der Dünndarmperistaltik wird über eine Aktivierung enterischer opioidergener Mechanismen und calciumabhängiger Kaliumkanäle vermittelt (Wenderoth 2002).

Um weitere Hinweise über den Wirkmechanismus der PAR-Agonisten zu erhalten, wurden die Darmsegmente vor der Applikation von jeweils  $100\text{nM}$  Thrombin, Trypsin, TRAP und SLIGRL mit  $10\mu\text{M}$  Midazolam vorbehandelt. Hierbei wurde die motilitätshemmende Wirkung von Midazolam durch die PAR 1-Agonisten (Thrombin, TRAP), nicht jedoch durch die PAR2-Agonisten (Trypsin, SLIGRL) verstärkt. Die Gründe hierfür sind schwierig zu erörtern. Obgleich die Aktivierung von PAR2-Agonisten eine hemmende Wirkung auf die Dünndarmmotilität hat, könnte es dennoch auch eine andere, möglicherweise properistaltische Wirkkomponente geben. Wie eingangs beschrieben, setzt eine Aktivierung von PAR2 aus verschiedenen Zellpopulationen, u.a.

Enterozyten, Prostaglandin  $E_2$  und  $F_{1\alpha}$  frei. Zahlreiche Studien, z.B. auch am gleichen *in vitro*-Dünndarmpräparat durchgeführt, bestätigen eine properistaltische Wirkung dieser Prostaglandine (Shahbazian et al. 2002, Moore 1988, Bennett et al. 1977, Sanger et al. 1978). Somit könnte die properistaltische Wirkung der von PAR2 freigesetzten Prostaglandine dem motilitätshemmenden Effekt des PAR2-Agonisten und Midazolam entgegenwirken.

Wie oben dargestellt, lässt sich die inhibitorische Wirkung der synthetisch hergestellten PAR-Agonisten SLIGRL und TRAP durch Vorbehandlung des Darms mit Naloxon aufheben. Somit ist sehr wahrscheinlich dass enterische opioiderge Mechanismen an der Wirkung der hier untersuchten PAR-Agonisten beteiligt sind. Denkbar wäre, dass die motilitätshemmende Wirkung des in der Anästhesie häufig eingesetzten Opiats Fentanyl durch Aktivierung der PAR verstärkt wird. Zur Klärung dieser Frage wurde vor der Applikation der Agonisten SLIGRL und TRAP der Darm mit Fentanyl vorbehandelt. Es zeigte sich jedoch, dass keine weiteren Interaktionen zwischen Opioiden und PARs bestehen und die inhibitorische Wirkung des Fentanyls weder durch PAR1- noch PAR2-Agonisten verstärkt wird. Diese fehlende Interaktion könnte aber auch durch einen ganz anderen Mechanismus erklärbar sein. Wenn beide Pharmaka ihre Wirkung über den gleichen Interaktionsmechanismus entfalten und wäre dieser nach Zugabe von Fentanyl bereits maximal blockiert. Diese Motilitätshemmung durch Opiate wird über alle drei Klassen der Opioidrezeptoren (Mu, Kappa, Delta) vermittelt (Lembo 2006, Shahbazian et al. 2002, Allescher et al. 2000, Kojima et al. 1994, Bauer et al. 1991) und beruht hauptsächlich auf einer Unterbrechung der Signalübertragung von enterischen Neuronen auf glatte Muskelzellen (Holzer 2004, Tonini et al. 1992). Ferner inhibieren Opiode die präsynaptische Freisetzung von Acetylcholin aus cholinergen Nerven (DeLuca et al. 1996) und in geringerem Ausmaß auch die NANC-Transmission (Wood et al. 2004). Eine verminderte NO-Freisetzung aus inhibitorischen enterischen Nervenendigungen wird ebenfalls als Wirkmechanismus diskutiert (Calignano et al. 1991). Wie geschildert, scheint

die Hemmung des Meerschweinchendünndarms durch PAR Agonisten Apamin-insensitiv zu sein. Somit wäre NO ein Transmitter, der für die durch PAR Agonisten vermittelte Hemmung des Darms in Betracht käme. Wenn tatsächlich die Freisetzung von NO durch Fentanyl vermindert ist, könnte dies hypothetisch eine Ursache für eine reduzierte Wirkung der PAR Agonisten sein.

## **5. Zusammenfassung**

Die Darmatonie bei Intensivpatienten beruht auf vielen Ursachen, die im Einzelnen bisher nur unvollständig untersucht sind. Kürzlich wurde eine neue Klasse von Rezeptoren, sog. Protease-Activated Receptors (PAR1, PAR2) in verschiedenen Organen, u.a. im Darm beschrieben. Über die physiologische Funktion der PARs im Darm ist wenig bekannt. In der vorliegenden Studie wird die Wirkung von der natürlichen Liganden (PAR1: Thrombin; PAR2: Trypsin) sowie der synthetisch hergestellten Liganden (PAR1: TRAP; PAR2: SLIGRL) auf die Dünndarmperistaltik untersucht. Hierzu wurden Segmente des Meerschweinchendünndarms im Organbad kontinuierlich mit Tyrodelösung gegen einen Druck von 400 Pa perfundiert. Dabei wird ab einer konstanten Schwelle des intraluminalen Drucks (peristaltik pressure threshold, PPT) eine von oral nach aboral verlaufende peristaltische Kontraktionswelle ausgelöst und der Darminhalt ausgeworfen. Unter Einfluss einer inhibitorisch wirkenden Substanz stieg die PPT an oder es waren bei kompletter Hemmung überhaupt keine peristaltischen Kontraktionen mehr auszulösen. Eine peristaltikanregende Wirkung zeigte sich hingegen in einer Absenkung der PPT.

Untersucht wurden je Substanz bzw. Substanzkombination sechs Segmente von sechs verschiedenen Meerschweinchen, wobei jedes Darmsegment nur mit einer Konzentration einer Substanz behandelt wurde. Die Signifikanzprüfung erfolgte auf dem Niveau von  $p < 0,05$  (Kolmogorov-Smirnov-Test, ANOVA).

Wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die synthetisch hergestellten Liganden an PAR1 und PAR2, SLIGRL und TRAP, die Dünndarmmotilität

konzentrationsabhängig hemmen. Im Gegensatz dazu zeigten die natürlichen Liganden an PAR1 und PAR2, Thrombin und Trypsin, keinen Effekt auf die Dünndarmmotilität.

Durch Vorbehandlung des Darms mit Antagonisten und Inhibitoren der vermuteten Signaltransduktionswege wurden die der Hemmung zugrunde liegenden Mechanismen untersucht. Die Hemmwirkung von TRAP und SLIGRL ließ sich durch Vorbehandlung des Darms mit Naloxon, nicht jedoch mit Apamin aufheben. Somit sind an der inhibitorischen Wirkung der PAR1- und PAR2-Agonisten am Meerschweinchendünndarm enterische, möglicherweise unspezifische opioiderge Mechanismen beteiligt, allerdings keine „low conductance  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  Channels“.

Die motilitätshemmende Wirkung des Benzodiazepins Midazolam wurde durch PAR1- (Thrombin, TRAP), nicht jedoch durch PAR2-Agonisten (Trypsin, SLIGRL) verstärkt. Der hemmende Effekt des Opiates Fentanyl wurde weder durch PAR1- oder PAR2-Agonisten beeinflusst.

## Literaturverzeichnis

**Ahn HS, Foster C, Boykow G, Stamford A, Manna M, Graziano M** (2000): Inhibition of cellular action of thrombin by (N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methyl-ethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quin-azoline-1,3-diamine) (SCH79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol* 60(10):1425-35.

**Al-Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD** (1995): Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1203-1207.

**Allescher HD, Storr M, Brechmann C, Hahn A, Schusdziarra V** (2000): Modulatory effect of endogenous and exogenous opioids on the excitatory reflex pathway of the rat ileum. *Neuropeptides* 34:62-68.

**Amadesi S, Bunnett N** (2004): Protease-activated receptors: protease signaling in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharm* 4:551-556.

**Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ, Stewart GA** (2002): Activation of Protease activated receptor (PAR)-1, Par-2 and Par-4 stimulates IL-6, IL-8 and Prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunology* 168:3577-3585.

**Babich M, King KL, Nissenson RA** (1990): Thrombin stimulates inositol phosphate production and intracellular free calcium by a pertussis toxin-insensitive mechanism in osteosarcoma cells. *Endocrinology* 126:946-954.

**Bathó L, Holzer P** (1995): The inhibitory modulation of guinea pig intestinal peristalsis caused by capsaicin involves calcitonin gene related peptide and nitric oxide. *Nauyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353:102-109.

**Baron P, Traber LD, Traber DL, et al.** (1994): Gut failure and translocation following burn and sepsis. *J Surg Res* 57:197-204.

**Barry GD, Le GT, Fairlie DP** (2006): Agonists and Antagonists of Protease activated receptors (Pars). *Curr Med Chem* 13:243-265.

**Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH** (1991): Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum. *Gastroenterology* 101:970-976.

**Bauer AJ, Schwarz NT, Moore BA, Türler A, Kalff JC** (2002): Ileus in critical illness: mechanisms and management. *Curr Opin Crit Care* 8:152-157.

**Bennett A, Eley KG, Stockley HL** (1976): Inhibition of peristalsis in guinea pig isolated ileum and colon by drugs that block prostaglandin synthesis. *Br J Pharmacol* 57:335-340.

**Berend KR, Lombardi AV Jr Mallory TH, Dodds KL, Adams JB** (2004): Ileus following total hip or knee arthroplasty with increased risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *J Arthroplasty* 19:82-86.

**Berg W, Herbert MK, Holzer P, Roewer N** (2001): The barbiturate methohexital inhibits intestinal peristalsis in vitro not through binding to GABA-receptors or activation of potassium channels but through activation of endogenous opioidergic pathway. *Anesthesiology* 95:A421.

**Blackhartt BD, Emilsson K, Nguyen D, Teng W, Martelli AJ, Nystedt S, Sundelin J, Scarborough RM** (1996): Ligand cross reactivity within the protease activated receptor family. *J Biol Chem* 271(28):16466-16471.

**Böhm SK, Khitin LM, Grady EF, Aponte G, Payan DG (1996):** Mechanisms of Desensitization and Resensitization of Proteinase-activated Receptors. *J Biol Chem* 271(36):22003-22016.

**Boeckxstaens GE, Hirsch DP, Kodde A, Moojen TM, Blackshaw A, Tytgat GN, Blommaert PJ (1999):** Activation of an adrenergic and vagally-mediated NANC pathway in surgery-induced fundic relaxation in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 11:467-474.

**Brehmer A (2006):** Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 186:1-91 Abstract.

**Brünnler T, Schölmerich J (2008):** Funktionsstörungen des Magen-Darm-Trakts. In: Burchardi, Larsen, Kuhlen, Jauch, Schölmerich (Hrsg.): *Die Intensivmedizin*, 548-568, 10. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

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

**Calignano A, Moncada S, Di Rosa M (1991):** Endogenous nitric oxide modulates morphine-induced constipation. *Biochem Biophys Res Commun* 181:889-893.

**Cattaruzza F, Cenac N, Barocelli E, Impicciatore M, Hyun E, Vergnolle N, Sternini C (2006):** Protective effect of proteinase-activated receptor 2 activation on motility impairment and tissue damage induced by intestinal ischemia/reperfusion in rodents. *Am J Pathol* 169(1):177-88.

**Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L (2003):** Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in Mice: Possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol* 170(8): 4296-300.

**Chow JM, Moffatt JD, Cocks TN** (2000): Effect of proteinase activated receptor (Par)-1,-2 and 4 activating peptides thrombin and trypsin in rat isolated airways. *Br J Pharm* 131(8):1584-91.

**Cocks TM, Sozzi V, Moffatt JD, Selemidis S** (1999): Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea-pig gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology* 116 (3):586-592.

**Covera CU, Déry O, McConalogue K, Böhm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW** (1997): Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase activated receptor 2. *J Clin Invest* 100(6):1383-93.

**Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Gamp P, Thoma M, Al-Ani B, Caughey GH, Hollenberg MD, Bunnett NW** (1999): Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J Physiol* 517:741-756.

**Cocks TM, Sozzi V, Moffatt JD, Selemidis S** (1999): Protease activated receptors mediate apamin sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology* 116:586-92.

**Cosentino M, Marino F, DePonti F, Giaroni C, Somaini O, Leoni S, Lecchini G, Frigo G** (1995): Tonic modulation of neurotransmitter release in the guinea pig myenteric plexus: effect of mu and kappa opioid receptor blockade and of chronic sympathetic denervation. *Neurosci Lett* 194:185-188.

**Cosola C, Albrizio M, Guaricci AC, DeSalvia MA, Zarrilli A, Sciorsci RL, Minoia R** (2006): Opioid Agonist/Antagonist effect of Naloxon in modulation rabbit jejunum contractility in vitro. *J Physiol Pharm* 57:439-449.

**Costall B, Naylor RJ, Tuladhar BR** (1993): 5-HT<sub>4</sub> receptor mediated facilitation of the emptying phase of the peristaltic reflex in the guinea pig isolated ileum. *Br J Pharmacol* 110:1572-1578.

**Coughlin SR** (2000): Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264.

**Coughlin SR, Camerer E** (2003): PARticipation in inflammation. *J Clin Invest* 111(1):25-7 Review.

**Christ JR, He XD, Goyal RK** (1992): Both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea pig ileum circular muscle. *J Physiol* 447:119-131.

**Déry O, Corvera C, Steinhoff M, Bunnett NW** (1998): Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274(6Pt1):C1429-52 Review.

**De Jonge WJ, Van Den Wijngaard RM, The FO, Ter Beek ML, Bennink RJ, Tytgat GNJ, Buijs RM, Reitsma PH, Van Deventer SJ, Boeckxstaens GE** (2003): Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* 125:1137-1147.

**De Jonge WJ, The FO, Van Der Coelen D, Bennink RJ, Reisma PH, Van Deventer SJ, Van Den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE** (2004): Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterol* 127:535-545.

**De Luca A, Coupar IM** (1996): Insights into opioid action in the intestinal Tract. *Pharmacol Ther* 69(2):103-115.

**De Winter** (2002): Study of the pathogenesis of paralytic ileus in animal models of experimental induced postoperative and septic ileus. *Verh Acad Geneesk Belg* 65(5): 293-324.

**Ding LA, Jie-Shou L** (2003): Gut in disease: Physiological elements and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 9(11):2385-2389.

**Donerer J, Holzer P, Lembeck F** (1984): Release of dynorphin, somatostatin and substance P from vascularly perfused small intestine of the guinea pig during peristalsis. *Br J Pharmacol* 83:919-925.

**Eberhart CF, Dubois RN** (1995): Eicosanoids and the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterol* 109:285-301.

**Eley KG, Bennett A, Stockley HL** (1977): The effects of prostaglandins E1, E2, F<sub>1α</sub> and F<sub>2α</sub> on guinea pig ileal and colonic peristalsis. *J Pharm Pharmacol* 29:276-280.

**Furness JB, Costa M** (1987): *The nervous system*. Churchill Livingstone London.

**Furness JB** (2000): Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81:87-96.

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

**Gao C, Liu S, Hu HZ, Gao N, Kim GY, Xia Y, Wood JD** (2002): Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea-pig small intestine. *Gastroenterology* 123:1554-1564.

**Gharzouli K, Holzer P** (2004): Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids Quercetin, Naringenin, Apigenin and Genistein. *Pharmacol* 70:5-14.

**Goyal RK, Hirano I** (1996): The enteric nervous system. *N Engl J med* 334(17):1106-15.

**Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW** (1996): Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 313:353-368.

**Green BT, Bunnett NW, Kulkarni-Narla A, Steinhoff M, Brown DR** (2000): Intestinal type 2 proteinase activated receptors: expression in opioid sensitive secretomotor neural circuits that mediate epithelial ion transport. *K Pharmacol Exp Ther* 295(1):410-6.

**Grider JR, Foxx-Orenstein AE** (1999): Mediators and regulation of peristalsis. *Curr Opin Gastroenterol* 15(1):22-28.

**Grundy D, Schemann M** (2005): The enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 21(2):176-82.

**Gutt CN, Köninger J, Büchler M** (2005): Postoperativer Ileus. *Operative Intensivmedizin* 1(3):261-272.

**Hansen MB** (2003): Neurohumoral Control of Gastrointestinal Motility. *Physiol Res* 52:1-30.

**Heinemann A, Holzer P** (1999a): Intestinal motor depression by 7-nitroindazole through an action unrelated to nitric oxide synthase inhibition. *Pharmacology* 59(6):310-20.

**Heinemann A, Shahbazian A, Bartho L, Holzer P (1999b):** Different receptors mediating the inhibitory action of exogenous ATP and endogenously released purines on guinea pig intestinal peristalsis. *Br J Pharmacol* 128:313-320.

**Henning GW, Hirst GDS, Park KJ, Smith CB, Sanders KM, Ward SM, Smith TK (2004):** Propagation of pacemaker activity in the guinea pig antrum. *J Physiol* 556(2):585-599.

**Herbert MK (1999a):** Impairment of Intestinal Motility in the critically ill Patient. Clinical Implications and Contribution of Drugs and Mediators. In: Herbert MK, Holzer P, Roewer N (Hrsg.): *Problems of the Gastrointestinal Tract in Anesthesia, the Perioperative Period and Intensive Care*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

**Herbert MK, Wenderoth H, Ritter M, Holzer P, Roewer N (1999b):** Midazolam induced inhibition is attenuated by apamin or naloxone, but not by flumazenil. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 34, p132.

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

**Herbert MK, Berg W, Kublik A, Holzer P, Roewer N (2002a):** Thio and oxybarbiturates inhibit peristalsis in the guinea pig ileum in vitro. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37:721-726.

**Herbert MK, Roth-Goldbrunner S, Holzer P, Roewer N (2002b):** Clonidine and Dexmedetomidine potently inhibit peristalsis in the guinea pig ileum in vitro. *Anesthesiol* 97:1491-9.

**Herbert MK, Weis R, Holzer P, Roewer R (2005):** Peristalsis in the guinea pig small intestine in vitro is impaired by acetaminophen but not aspirin and dipyrrone. *Anesth Analg* 100(1): 120-7.

**Herbert MK, Weis R, Holzer P (2007):** The enantiomers of tramadol and its major metabolite inhibit peristalsis in the guinea pig small intestine via differential mechanisms. *BCM Pharmacol* 7:5.

**Herbert MK, Holzer P (2008):** Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients – Current status and future options. *Clin Nutr* 27:25-41.

**Hirst GDS (1979):** Mechanisms of peristalsis. *Br Med Bull* 35(3):263-268.

**Hollenberg MD, Yang SG, Laniyonu AA, Moor GJ, Saifeddine M (1992):** Action of thrombin receptor polypeptide in gastric smooth muscle: identification of a core pentapeptide retaining full thrombin mimetic intrinsic activity. *Mol Pharmacol* 42(2):186-91.

**Hollenberg MD, Laniyonu AA, Saifeddine M, Moore GJ (1993):** Role of the amino- and carboxyl-terminal domains of thrombin receptor-derived polypeptides in biological activity in vascular endothelium and gastric smooth muscle; evidence for receptor subtypes. *Molecular Pharmacology* 43(6):921-930.

**Hollenberg MD, Saifeddine M, Al-Ani B, Kawabata A (1997):** Proteinase activated receptor: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides. *Can J Physiol Pharmacol* 75:832-841.

**Hollenberg MD, Compton SJ (2002):** International Union of Pharmacology XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 54:203-217.

**Holte K, Kehlet H** (2000): Postoperative ileus: a preventable event. *Br J Surg* 87:1480-1493.

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

**Holzer P, Schluet W, Maggi CA** (1995): Substance P stimulates and inhibits intestinal peristalsis via distinct receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 274:322-328.

**Holzer P** (1997): Involvement of nitric oxide in the substance P-induced inhibition of intestinal peristalsis. *Neuroreport* 8:2857-2869.

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

**Holzer P, Shahbazian A, Painsipp E, Heinemann A** (2003): Evaluation of peristalsis in multiple segments of the guinea pig isolated small intestine: optimisation of tissue use by refined in vitro methodology. *Altern Lab Anim* 31:419-427.

**Holzer P** (2004): Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetic therapy in humans. *Neurosci Lett* 361:192-196 Minireview.

**Huizinga JD, Ambrous K, Der-Silaphet** (1998): Co-operation between neural and myogenic mechanisms in the control of distension-induced peristalsis in the mouse small intestine. *J Physiol* 506(3):843-856.

**Huang R, Sorisky A, Church WR, Simons ER, Ritterhouse SE (1991):** Thrombin receptor-directed ligand accounts for activation by thrombin of platelet phospholipase C and accumulation of 3-phosphorylated phosphoinositides. *J Biol Chem* 266:18435-18438.

**Huang SC (2007):** Protease-activated receptor-1 (PAR)1 and PAR2 but not PAR4 mediate relaxations in lower esophageal sphincter. *Regulatory Peptides* 142:37-43.

**Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR (1992):** The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 267:20831-20834.

**Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR (1997):** Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature (Lond)* 386:502-506.

**Jonasson L, Holm I, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986):** Regional accumulations of T cells macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 6(2):131-8.

**Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ (1999):** Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 117:378-387.

**Kawabata A, Kuroda R, Nishikawa H, Kawai K (1999a):** Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation. *Br J Pharm* 128:865-872.

**Kawabata A, Saifeddine M, Al-Ani B, Leblond L, Hollenberg MD (1999b):** Evaluation of proteinase-activated receptor-1 (PAR1) agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay: activation of PAR2 by PAR1-targeted ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 288(1):358-70.

**Kawabata A, Kuroda R, Kuroki N, Nishikawa H, Kawai K, Araki H (2000a):** Characterisation of the proteinase-activated receptor-1-mediated contraction and relaxation in the rat duodenal smooth muscle. *Life Sci* 67(20):2521-2530.

**Kawabata A, Kuroda R, Kuroki N, Nishikawa H, Kawai K (2000b):** Dual modulation by thrombin of the motility of rat oesophageal muscularis mucosae via two distinct protease activated receptors (Pars): a novel role for Par-4 as opposed to Par-1. *Br J Pharmacol* 131:578-584.

**Kawabata A, Kuroda R, Nagata N, Kawao N, Masuko T, Nishikawa H, Kawai K (2001):** In vivo evidence that protease activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in mouse. *Br J Pharm* 133:1213-1218.

**Kawabata A, Kawao N (2005):** Physiology and Pathophysiology of Proteinase-Activated Receptors (Pars): Pars in the Respirators System: Cellular signaling and physiological/Pathological Roles. *J Pharmacol Sci* 97:20-24 Minireview.

**Kellow JE, Delvaux M, Azpiroz F, Camilleri M, Quigley EMM, Thompson DG (1999):** Principles of applied neurogastroenterology: physiology/motility-sensation. *Gut* 45:(Suppl II)II17-II24.

**Kirkup AJ, Jiang W, Bunnett NW, Grundy D (2003):** Stimulation of proteinase-activated receptor 2 excites jejunal afferent nerves in anaesthetised rats. *J Physiol* 552(2):589-601.

**Koijima Y, Takahashi T, Fujina M, Owyang C (1994):** Inhibition of cholinergic transmission by opiates in ileal myenteric plexus is mediated by kappa receptor.

Involvement of regulatory inhibitory G protein and calcium N-channels. *J Pharmacol Exp Ther* 268:965-970.

**Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG (1997):** Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activates receptor 2. *Proc Natl Acad Sci* 94:8884-8889.

**Koolman J, Röhm KH (2002):** Taschenatlas der Biochemie. 3. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.

**Kosterlitz HW, Pirie VW, Robinson JA (1956):** The mechanism of the peristaltic reflex in the isolated guinea pig ileum. *J Physiol* 133:681-694.

**Kosterlitz HW, Lees GM (1964):** Pharmacological analysis of intrinsic intestinal reflexes. *Pharmacol Rev* 16:301-339.

**Kraft MD (2007):** Emerging pharmacologic options for treating postoperative ileus. *Am J Health Syst Pharm* 64(Suppl13):13-20.

**Kromer W, Pretzlaff W, Woinoff R (1981):** Regional distribution of an opioid mechanism in the guinea-pig isolated intestine. *J Pharm Pharmacol* 33(2):98-101.

**Kurz A, Sessler DI (2003):** Opioid-induced bowel dysfunction. *Drugs* 63(7):649-671 Review.

**Laniyonu AA, Hollenberg MD (1995):** Vascular actions of thrombin receptor derived polypeptides: structure activity profiles for contractile and relaxant effect in rat aorta. *Br J Pharmacol* 114(8):1680-6.

**Lee MC, Huang SC** (2008): Proteinase-activated receptor-1 (PAR1) and PAR2 but not PAR4 mediate contraction in human and guinea-pig gallbladders. *Neurogastroenterol Motil* 20(4):385-91.

**Lembo A** (2006): Peripheral opioids for functional GI disease: a reappraisal.

**Linden DR, Manning BP, Bunnett NW, Mawe GM** (2001): Agonists of proteinase-activated receptor 2 excite guinea pig ileal mesenteric neurons. *Eur J Pharm* 431:311-314.

**Liu BH, Zhang SB** (2004): Effects of mu and kappa opioid receptor agonists and antagonists on contraction of isolated colon strips of rats with cathartic colon. *World J Gastroentol* 10(11):1672-1674.

**Löffler G, Petries PE, Heinrich PC** (2006): *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Auflage Springer Verlag Berlin.

**Luckey A, Livingston E, Taché Y** (2003): Mechanismus and Treatment of Postoperative Ileus. *Arch Surg* 138:206-214.

**Madl C, Druml W** (2003): Systemic consequences of ileus. *Best Prac Res Clin Gastro* 17(3):445-456.

**MacFarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R** (2001): Proteinase-Acivated Receptors. *Am Soc Pharm Exp Ther* 53(2):246-275.

**Moore PK** (1988): Eicosanoids and gastrointestinal motility. In: Hiller K, ed. *Eicosanoids and the gastrointestinal tract*. Boston: MTP:145-162.

**Mulè F, Baffi MC, Cerra MC** (2002): Dual effect mediated by protease-activated receptors on the mechanical activity of rat colon. *Br J Pharmacol* 136:367-374.

**Mulé F, Baffi MC, Capparelli A, Pizzuti R** (2003): Involvement of nitric oxide and tachykinins in the effects induced by protease-activated receptors in rat colon longitudinal muscle. *Br J Pharmacol* 139:598-604.

**Neer EJ, Clapham DE** (1988): Roles of G-protein subunits in transmembrane signaling. *Nature* 333:129-134.

**Noorbakhsh F, Vergnolle N, Hollenberg M, Power** (2003): Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4(12):981-90 Review.

**Nguyen C, Coelho A, Grady E, Compton SJ, Wallace JL, Hollenberg MD, Cenac N, Garcia-Villar R, Bueno L, Steinhoff M, Bunnett NW, Vergnolle N** (2003): Colitis induced by proteinase-activated receptor-2-agonists is mediated by a neurogenic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 81(9):920-7.

**Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J** (1994): Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(20):9208-12.

**O'Brien P, Molino M, Kahn M, Brass L** (2001): Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* 20:1570-1581.

**Ogilvy AJ, Smith G** (1995): The gastrointestinal tract after anaesthesia. *Eur J Anaesthesiol* 12(Suppl.10):35-42.

**Ossovskaya VS, Bunnett NW** (2004): Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Physiol Rev* 84(2):579-62 Review.

**Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G, Tencati M, Holscher T, Boisvert W, Andrade-Gordon P, Frank RD, Mackman N** (2004): Role of tissue factor

and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood* 103(4):1342-7.

**Piros ET, Prather PL, Law PY, Evans CJ, Hales TG** (1996): Voltage-dependent inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels in GH3 cells by cloned mu- and delta-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 50:947-956.

**Ragaller M, Gottschlich B** (2005): Akutes Darmversagen in der Intensivmedizin. *Intensivmed* 42: 627-638.

**Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, Velazquez-Rocha S, Dery O, Grady EF, Bunnett NW, Vanner SJ** (2003): Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 547:531-542.

**Riewald M, Ruf W** (2003): Science review: Role of coagulation protease cascades in sepsis. *Crit care* 7:123-129.

**Ritz MA, Fraser R, Tam W, Dent J** (2000): Impacts and patterns of disturbed gastrointestinal function in critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 95:3044-52.

**Ross R** (1993): The pathogenesis of atherosclerosis a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809 Review.

**Sabri A, Muske G, Zhang H, Pak E, Darrow A, Andrade-Gordon P, Steinberg SF** (2000): Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease activated receptors. *Circ Res* 86:1054-1061.

**Saifeddine M, Al-Ani B, Cheng CH, Wang L, Hollenberg MD** (1996): Rat proteinase-activated receptor 2 (Par-2): cDNA sequence and activity of receptor-derived peptides in gastric and vascular tissue. *Br J Pharmacol* 118:521-530.

**Sanger GJ, Watt AJ** (1978): The effect of PGE1 on peristalsis and on perivascular nerve inhibition of peristaltic activity in the guinea pig isolated ileum. *J Pharm Pharmacol* 30:762-765.

**Sarna SK** (2006): Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G545-G555.

**Schemann M** (2005): Control of Gastrointestinal Motility by the "Gut Brain"-The enteric Nervous System. *J Pedia Gastroentero Nutr* 41:4-6.

**Schmidlin F, Bunnett N** (2001): Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. *Curr Opin Pharm* 1:575-582.

**Schultheiss M, Neumcke B, Richter HP** (1997): Endogenous trypsin receptors in *Xenopus* oocytes: linkage to internal calcium stores. *Cell Mol Life Sci* 53:842-849.

**Seckiguchi F, Hasegawa N, Inoshita K, Yonezawa D, Ioni N, Kanke T, Saito N, Kawabata A** (2006): Mechanisms for modulation of mouse gastrointestinal motility by proteinase activates receptor (Par) -1 and -2 in vitro. *Life Sci* 78(9):950-7.

**Seiler SM, Michel IM, Fenton JW** (1992): Involvement of the „tethered-ligand“receptor in thrombin inhibition of platelet adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 182:1296-1302.

**Shahbazian A, Schuligoi R, Heinemann A, Peskar BA, Holzer** (2001): Disturbance of peristalsis in the guinea pig isolated small intestine by indomethacin, but not cyclooxygenase isoform selective inhibitors. *Br J Pharm* 132:1299-1309.

**Shahbazian A, Heinemann A, Schmidhammer H, Beubler E, Holzer-Petsche U** (2002a): Involvement of mu- and kappa-, but not delta-, opioid receptors in the peristaltic motor depression caused by endogenous and exogenous opioids in the guinea pig intestine. *Br J Pharm* 135:741-750.

**Shahbazian A, Heinemann A, Peskar BA, Holzer P** (2002b): Differential peristaltic motor effects of prostanoid (DP, E, IP, TP) and leukotriene receptor agonists in the guinea pig isolated small intestine. *Br J Pharm* 137:1047-1054.

**Shapiro MH, Weiss EJ, Faruqi R, Coughlin SR** (2000): Protease activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J Biol Chem* 275:25216-25221.

**Shouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T** (2008): Inflammation, endothelium and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83(3): 536-45.

**Stechmiller JK, Treloar D, Allen N** (1997): Gut dysfunction in critically ill patient: a review of the literature. *Am J Crit Care* 6(3):204-9.

**Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD** (2005): Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26(1):1-43.

**Stewart D, Kenneth W** (2007): Management of Postoperative Ileus. *Am J Ther* 14:561-566.

**Tokuyama S, Ho IK** (1996): Inhibitory effects of diltiazem, an L-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, on naloxone increased glutamate levels in the locus coeruleus of opioid-dependent rats. *Brain Res* 722:212-216.

**Tonini M, Watermann SA, Candura SM, Coccini T, Costa M** (1992): Sites of action of morphine on the ascending excitatory reflex in the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett* 144:195-198.

**Trendelenburg P** (1917): Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 81:55-129.

**Trejo J** (2003): Protease-activated Receptors: New Concepts in Regulation of G Protein-coupled Receptor signaling and Trafficking. *J Pharm Exper Ther* 307:437-442.

**Vassallo RR, Kieber-Emmons T, Cichowski K, Brass LF** (1992): Structure function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J Biol Chem* 267:6081-6085.

**Vergara C, Latorre R, Marrion N, Adelman J** (1998): Calcium activated potassium channels. *Curr Opin Neurobio* 8:321-329.

**Vergnolle N** (2000): Review article: proteinase-activated receptors – novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther* 14:257-266.

**Vergnolle N, Ferazzini M, D'Andrea M, Buddenkotte J, Steinhoff M** (2003): Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. *Trends in Neuroscience* 26(9): 496-500.

**Vergnolle N, Gellars L, Mencarelli A, Rizzo G, Swaminathan S, Beck P, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Bunnett NW, Hollenberg MD, Wallace J, Cirino G, Fiorucci S** (2004): A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 114:1444-1456.

**Vergnolle N** (2005): Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut. *Gut* 54:867-874.

**Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR** (1991): Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1068.

**Wang H, Ubl JJ, Reiser G** (2002): Thrombin (Par 1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1351-1364.

**Waterman SA, Cost M, Tonini M** (1992): Modulation of peristalsis in the guinea pig isolated small intestine by exogenous and endogenous opioids. *Br J Pharm* 106:1004-1010.

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

**Waterman SA, Tonini M, Costa M** (1994b): The role of ascending excitatory and descending inhibitory pathways in peristalsis in the isolated guinea pig small intestine. *J Physiol* 481:223-232.

**Wenderoth H** (2002): Wirkung des Benzodiazepins Midazolam auf die Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens in vitro. Dissertation. Universität Würzburg Medizinische Fakultät urn:nbn:de:bvb:20-opus-3325.

**Wood JD, Alpers DH, Andrews PL** (1999): Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45(Suppl 2):II6-II16.

**Wood JD, Galligan JJ** (2004): Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16(suppl 2):17-28.

**Yang SG, Laniyonu A, Saifeddine M, Moore GJ, Hollenberg MD (1992):** Actions of thrombin and thrombin receptor peptide analogues in gastric and aortic smooth muscle: development of bioassays for structure-activity studies. *Life Sci* 51(17):1325-32.

**Zhao A, Shea-Donohue T (2003):** Par 2 agonists induce contraction of murine small intestine through neurokinin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(4):696-703.

**Ziegler TR, Smith RJ, O'Dwyer ST, Demling RH, Wilmore DW (1988):** Increased intestinal permeability associated with infection in burn patients. *Arch Surg* 1988;123:1313-9.

## Anhang

$G_q$  aktiviert die Phospholipase C, wodurch die Bildung der zwei second messenger,  $IP_3$  mit anschließender  $Ca^{2+}$  Mobilisation und DAG mit folgender Aktivierung von PKC folgt. Diese stellt wiederum einen Regulator für Transkriptionsfaktoren dar, und beeinflusst somit auch die Genexpression.  $G_{12/13}$  bindet guanine-nucleotid Austauschfaktoren (GEFs), welche RhoA abhängig zu Zellteilung und Migration führen. RhoA zählt zur Gruppe der kleinen ras-verwandten G-Proteinen. Neben einer Inhibierung von cAMP stimuliert  $G_i$  sowohl die Phospholipase C sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase, wodurch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade (MAPK) gestartet wird. Diese stellt ebenfalls einen bedeutenden Signalübertragungsweg dar. Hierbei handelt es sich um Serin/Threoninkinasen. Einerseits die vorwiegend bei wachstumsfördernden Prozessen aktivierten Kinasen ERK1 und ERK2 (extracellular signal regulated kinases) und andererseits die Familie p38 Kinasen sowie c-Jun N-terminale Kinase, die durch extrazellulären Stress sowie pro-inflammatorische Cytokine aktiviert werden. Dieser Signalweg kann durch  $G_i$  sowie  $G_q$  vermittelt werden um so die Zellproliferation zu regulieren (Abb. 2) (Löffler et al. 2006, Kawabata et al. 2005, Noorbakhsh et al. 2003, Wang et al. 2002, Hung et al. 1992, Babich et al. 1990).

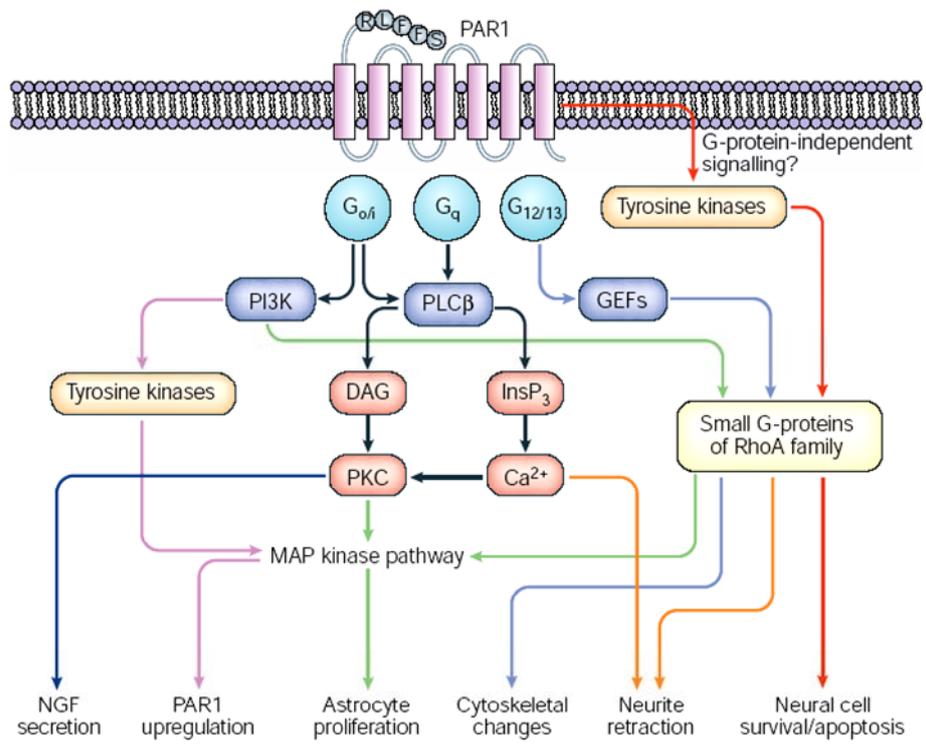


Abb.3: PAR 1 Signaltransduktionsmechanismus. Quelle: entnommen aus Noorbakhsh et al. 2003.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. M. Herbert, der mir das interessante Thema überlassen hat und mit großem persönlichem Einsatz betreut hat. Sein Interesse an der Arbeit, die vielen wertvollen Anregungen und freundschaftliche Zusammenarbeit haben mir sehr geholfen.

Bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Wischmeyer bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. R. Weis und Herrn Fahr möchte ich für die Einarbeitung im Labor danken. Theresia Hoh danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und nette Atmosphäre im Labor.

Viele haben mir mit großen und kleinen Dingen geholfen. Da ich an dieser Stelle nicht alle aufzählen kann, danke ich allen, deren Hilfe ich während meiner Arbeit im Labor und beim Zusammenschreiben dieser Arbeit erfahren durfte.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern, die meinen Lebensweg liebevoll begleiten.