

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Van Aken

**Der Einfluss von nor-Binaltorphimin auf die Splanchnikusperfusion
im chronisch instrumentierten, wachen Hund**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Barth, Florian
aus Münster

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T.P. Weber

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. V. Bullmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.07

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Van Aken-
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T.P. Weber
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. V. Bullmann

Der Einfluss von nor-Binaltorphimin auf die Splanchnikusperfusion im chronisch instrumentierten, wachen Hund

Barth, Florian

Nor-Binaltorphimin (nor-BNI) ist ein exogener Opioidrezeptor-Antagonist, welcher selektiv am κ -Rezeptor angreift (Endoh et al., 1992). Bisherige Studien konnten, für den nicht selektiven Opioidrezeptor Antagonisten Naloxon in vivo, eine perfusionssteigernde Wirkung am Intestinum zeigen (Brandt et al., 1999). Weiter konnte ein hemmender Einfluss auf die Motilität des Pylorus durch den selektiven κ -Opioidrezeptor Agonisten Dynorphin-(1-13) im akuten Tiermodell gezeigt werden (Allescher et al., 1988). Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer selektiven κ -Rezeptor Blockade mit nor-BNI auf die Splanchnikusperfusion, und im Speziellen die Perfusion des Intestinums, am chronisch instrumentierten, wachen Hund zu untersuchen. Nach Genehmigung der Bezirksregierung Münster (Az.: 50.0835.1.0 (G 86/2000)), wurden zehn Foxhounds in einem chirurgischen Eingriff chronisch instrumentiert. Es wurden Katheter zur Messung des mittleren systemarteriellen Drucks in die Aorta, zur Messung des linksatrialen Drucks in das linke Herzohr, und ein Mikromanometer zur Messung des linksventrikulären Druckes und dessen erster Ableitung nach der Zeit ($LV \frac{d_p}{d_t}$) in den linken Ventrikel, implantiert. Blutentnahmen zur Bestimmung der Katecholaminspiegel und Opioidpeptidspiegel im Plasma, sowie die Applikation von fluoreszierenden Microsphären zur Bestimmung der regionalen Organperfusion, konnten ebenfalls über die Katheter durchgeführt werden. Nach mindestens zwölf-tägiger Erholungsphase wurde die erste Messung unter Ausgangsbedingungen durchgeführt. Im Anschluss wurde nor-BNI in einer Dosis von 2,5 mg/kgKG über den links-atrialen Katheter i.v. infundiert. 24 Stunden später, zum Zeitpunkt der maximalen κ -Rezeptor antagonistischen Wirkung, wurde eine erneute Messung inklusive Blutentnahme durchgeführt. Gezeigt werden konnte das eine selektive κ -Opioid-Rezeptor Blockade (1.) die Inotropie und das Herzzeitvolumen (HMV) steigert, (2.) die Perfusion vor allem im Intestinum steigert, und (3.) eine Perfusionsumverteilung zugunsten des Splanchnikus stattfindet. Eine intrinsische Aktivität des nor-BNI kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.07

Aktenzeichen tierexperimentelle Genehmigung: 50.0835.1.0 (G 86/2000)

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis und Abbildungsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Grundlagen der Splanchnikusperfusion	1
1.2 Das endogene Opioidsystem	2
1.3 Ziel der Studie (Hypothese)	4
2. Modell	5
2.1 Begründung für das Modell	5
2.2 Operative Instrumentierung	5
2.3 Postoperatives Management	7
3. Versuchsprotokoll	9
4. Messmethoden	11
4.1 Bestimmung der regionalen Organperfusion	11
4.2 Bestimmung der Plasmakatecholaminspiegel	13
4.3 Bestimmung der endogenen Opioidpeptidspiegel im Plasma	14
4.4 Bestimmung hämodynamischer Parameter	15
4.4.1 Messung des intraaortalen Druckes (MAP)	15
4.4.2 Messung des linksatrialen Druckes (LAP)	15
4.4.3 Messung des linksventrikulären Druckes (LVP)	16
4.4.4 Bestimmung der linksventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit	16
4.5 Echokardiographische Untersuchung des Herzens	16

5. Untersuchtes Pharmakon – nor-Binaltorphimin	18
6. Datenerfassung und Statistik	20
7. Ergebnisse	21
7.1 Hämodynamik	21
7.2 Regionaler Blutfluss	25
7.3 Arterielle Plasmaspiegel von Adrenalin und Noradrenalin	29
7.4 Arterielle Plasmaspiegel von Dynorphin A und β -Endorphin	31
8. Diskussion	33
8.1 Einleitung	33
8.2 Diskussion des Versuchsmodells	33
8.3 Physiologie, Regulation und Interaktion der Splanchnikusperfusion	34
8.4 Das endogene opioid System	36
8.5 Der Einfluss auf die Inotropie des Herzens	37
8.6 Der Einfluss auf die Motilität des Intestinums	37
8.7 Der Einfluss auf den regionalen Blutfluss	38
8.8 Diskussion der Ergebnisse	39
8.9 Zusammenfassung	42
9. Literaturverzeichnis	42
Danksagung	52
Lebenslauf	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Hämodynamikdaten	Seite 21
Tabelle 2	Regionaler Blutfluss	Seite 26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	Seite 10
Abbildung 2	Strukturformel nor-Binaltorphimin (nor-BNI)	Seite 19
Abbildung 3	Herzzeitvolumen unter Ausgangsbedingungen und nach Applikation von nor-BNI	Seite 22
Abbildung 4	Herzfrequenz unter Ausgangsbedingungen und nach Applikation von nor-BNI	Seite 23
Abbildung 5	Mittlerer aortaler Blutdruck unter Ausgangsbedingungen und nach Applikation von nor-BNI	Seite 23
Abbildung 6	Mittlerer linksatrialer Blutdruck unter Ausgangsbedingungen und nach Applikation von nor-BNI	Seite 24
Abbildung 7	Regionaler Blutfluss des Magens unter Ausgangsbedingungen und nach Applikation von nor-BNI	Seite 27
Abbildung 8	Regionaler Blutfluss des Intestinums unter Ausgangsbedingungen und nach Applikation von nor-BNI	Seite 28
Abbildung 9	Regionaler Blutfluss ausgewählter Organsysteme unter Ausgangsbedingungen und nach Applikation von nor-BNI	Seite 29
Abbildung 10	Plasmakatecholaminspiegel	Seite 30
Abbildung 11	β -Endorphin Plasmaspiegel	Seite 31
Abbildung 12	Dynorphin-A Plasmaspiegel	Seite 32

Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	Arteria/Aeriae
ADR	Adrenalin
bpm	Schläge pro Minute
CI	Cardiac Index
EF	Ejektionsfraktion
°C	Grad Celsius
g	Gramm
HMV	Herzminutenvolumen
HF	Herzfrequenz
kg	Kilogramm
LAP	linksatrialer Druck
LV d_p / d_t	linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
LVP	linksventrikulärer Druck
M.	Musculus
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
mg	Milligramm
Mhz	Megahertz
min	Minute(n)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
µm	Micrometer
NA	Noradrenalin
nor-BNI	nor-Binaltorphimin
p_a	partieller arterieller Gasdruck
PER	Peak Ejektion Rate

pg	Picogramm
PFR	Peak Filling Rate
RBF	regionaler Blutfluss
U/min	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen der Splanchnikusperfusion

Die Perfusion des Splanchnikusgebietes unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren. So ist die nervale Versorgung durch Fasern des sympathischen und des parasympathischen Nervensystems eine wichtige Einflussgröße. Signale beider Systeme treffen hierbei, speziell im Intestinum, auf Fasern des autonomen Plexus myentericus, sowie des Plexus submukosus. Der Einfluss des Parasympathikus kann als stimulierend, der des Sympathikus als hemmend auf die autonomen Plexus beschrieben werden. Weiteren Einfluss, speziell auf die Perfusion, nehmen das Herzminutenvolumen (HMV) (Schwartzkopff et al., 2005), und die intramurale Spannung (Portas Gonzales et al., 2003). In diesem komplexen Zusammenspiel konnte bisher nur wenigen Mediatoren, wie Angiotensin II, Bradykinin oder Vasopressin, ein definitiv regulatorischer Einfluss auf die Perfusion nachgewiesen werden (Matheson et al., 2000). Auch Opioid-Rezeptoren im myenterischen- und submukösem Plexus des Intestinals (Daniel et al., 1985; Edin et al., 1980) sind an der Regulation der Perfusion beteiligt. Weiter scheinen Opioide bei der Regulation der Motilität beteiligt und sind in dieser Eigenschaft beim Menschen beschrieben (Ferry et al., 1987). So ist unter Einfluss von Opioiden die gastrale Entleerung verzögert (Sullivan et al., 1981) und die intestinale Passage prolongiert (Fiocchi et al., 1982). Bedeutsam wird diese Tatsache bei Patienten welche hohe Dosierungen exogen zugeführter Opiate verabreicht bekommen. Die genannte Konstellation findet sich, oft in Kombination mit hohen Spiegeln endogener Opioide, bei intensivpflichtigen Patienten häufig nach Unfall- oder chirurgischem Trauma, z.B. ausgedehnten abdominalen Eingriffen (Taguchi et al., 2001) oder Schock. Ein hoher Plasmaspiegel an endogenen Opioiden und Katecholaminen besteht hier durch Stressaktivierung (Andeman et al., 1994), der an exogenen Opiaten durch die exogene Schmerztherapie. Durch Minderperfusion des Gastrointestinaltraktes im Schock kann so die Barrierefunktion der Mukosa soweit herabgesetzt werden (Ince et al., 1999), dass es zum Übertritt von Bakterien und Toxinen in das Gefäßsystem kommt (Frey L., 2000). Folge ist die Ausbildung einer Sepsis mit anschließendem Multiorganversagen (Landow et al., 1994).

Dieses Krankheitsbild stellt mit 135000 Todesfällen pro Jahr (Davies et al., 2001) die Haupttodesursache auf traumatologischen Intensivstationen der westlichen Welt dar (Sands et al., 1997). Vorrangiges Ziel der Behandlung muss es also sein, die intestinale Perfusion trotz hoher Plasmaspiegel an exogen zugeführten Opiaten und niedrigem HMV (Schock) aufrecht zu halten.

1.2 Das endogene Opioidsystem

Das endogene Opioidsystem setzt sich im Wesentlichen aus drei verschiedenen Peptiden zusammen: Endorphine (Li et al.; 1976), Enkephaline (Hughes et al.; 1975) und Dynorphine (Goldstein et al.; 1979), wobei jedes Peptid aus einer eigenen Vorstufe synthetisiert wird, Proopiomelanocortin, Proenkephalin und Prodynorphin. Die Existenz weiterer Peptide ist jedoch bereits nachgewiesen. Das Vorkommen der Substanzen wurde u.a für Hypophyse, Hypothalamus, Schilddrüse, Nebennieren, Herz und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen, wobei die Konzentrationen sich in den einzelnen Organen unterscheiden. Die Hauptbindungsstellen der Opioidpeptide sind der μ -, δ - und κ - Opioid-Rezeptor (Dhawan et al.; 1996). Die Peptide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Affinitäten zu den Rezeptoren, wobei Dynorphin A bevorzugt am κ -Opioid-Rezeptor und β -endorphin am μ -Opioid-Rezeptor bindet. Inzwischen geht man von der Existenz weiterer Rezeptoren, wie z.B. des σ -, und des ϵ -Rezeptors, aus. Analog der Opioidpeptide ist die Verteilung der Rezeptoren ebenfalls organspezifisch. Die Opioide werden hauptsächlich unter Stress, z.B. nach einem Trauma, in die Blutbahn freigesetzt (Andeman et al.; 1994, Nieber et al.; 1985) und können entwicklungsgeschichtlich zu den Mediatoren der Flucht- und Kampfreaktionen gezählt werden.

Am kardiovaskulären System haben die endogenen Opioide eine Funktion bei der Regulation der Funktion (Holaday et al.; 1983) über periphere und zentrale Opioid-Rezeptoren (Gautret et al.; 1985). Durch Beeinflussung von HMV und Gefäßtonus somit auch auf die Splanchnikusperfusion. Bereits 1986 konnte die direkte Dynorphin-(1-13) vermittelte Relaxation der A. mesenterica superior der Ratte in vitro gezeigt werden (Kannan et al.; 1986).

Der direkte Einfluss der einzelnen endogenen Opioidpeptide auf das Intestinum wurde 1988 in einem Tierversuchsmodell mit exogen hergestellten selektiven Opioid-Rezeptor Agonisten beschrieben (Allescher et al.; 1988) wobei Dynorphin-(1-13) dosisabhängig den stärksten hemmenden Einfluss auf die Motilität des Pylorus im Hund zeigte. Dieser Effekt konnte an Studien in vitro mit Geweben von Maus und Meerschwein bestätigt werden (Goldstein et al.; 1979). Erste Versuche die unerwünschten intestinalen Motilitätsstörungen nach ausgedehnten abdominalen Eingriffen mit unselektiven nicht zentral wirksamen Opioid-Rezeptor Antagonisten im Patienten positiv zu beeinflussen verliefen erfolgreich (Taguchi et al.; 2001).

Ebenfalls einen Hinweis darauf, dass die intestinale Perfusion sich durch Opioid-Rezeptor Antagonisten positiv beeinflussen lassen könnte, liefert eine Studie bei welcher der unselektive Opioid-Rezeptor Antagonist Naloxon zusammen mit der Prämedikation vor einer Koloskopie eingesetzt wurde (Brandt et al.; 1999). Physiologische Gefäße und pathologische Ektasien sollten so besser darzustellen sein. Bei 17,8 % der Patienten konnte eine koloskopisch deutliche Zunahme der sichtbaren Vaskularisation beobachtet werden, allerdings ist ein Einfluss der sedativen Prämedikation hier nicht sicher auszuschließen.

1.3 Ziel der Studie (Hypothese)

Welchen Effekt, und welche Interaktionen, hat der selektive κ -Opioidrezeptor Antagonist nor-Binaltorphimin auf die Hämodynamik des chronisch instrumentierten Hundes, und welche Auswirkungen bestehen auf die gastro-intestinale Perfusion?

2. Modell

2.1 Begründung für das Modell

Die beschriebene Versuchsreihe wurde an chronisch instrumentierten Hunden durchgeführt, da die durchgeführte umfangreiche Instrumentierung nur am Grosstiermodell zu realisieren ist. Zudem sind Hunde sehr gut für das experimentelle Setting trainierbar, so dass Störfaktoren wie Unruhe und Stress sicher beherrscht werden können ohne auf Sedativa zurückgreifen zu müssen, welche ihrerseits einen ungewünschten Einfluss auf das kardiovaskuläre System als auch auf die Reaktion bei Intervention haben (Vatner et al.,1971). Die Tiere wurden mehrere Wochen vor der operativen Intervention an das spätere Versuchssetting gewöhnt.

2.2 Die operative Instrumentierung

Vor Beginn der eigentlichen Messreihe wurden die Hunde mit intrakardialen- und intravaskulären Messsonden instrumentiert. Diese ermöglichten zu jeder Zeit eine exakte Aussage über den arteriellen Blutdruck, den linksatrialen- und linksventrikulären Blutdruck. Da die Aufzeichnung im Echtzeitverfahren erfolgt waren Einflüsse einer modifizierten Inotropie auf die Darmperfusion direkt zu erkennen. Die quantitative Bestimmung der Perfusionsverteilung wurde mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären (Abschnitt 4.1) durchgeführt.

Die zwischen 20 kg und 25 kg schweren Fox-Hunds wurden mit 5 mg/kg Ketamin (Ketanest[®] S, Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland) und 1 mg/kg Piritramid (Dipidolor[®], JANSSEN Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgien) als Injektion in den M. gluteus prämediziert. Diese Maßnahme erleichterte das anschließende Platzieren einer peripheren 18 Gauge Venenverweilkanüle (Insyste-W[™], Becton Dickinson Vascular Access, Utah, USA) in die V. saphena und ermöglichte eine für den Hund stressfreie Narkoseeinleitung mit 5 mg/kg Propofol (Disoprivan[®] 1%, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) und 0,4 mg Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,5mg[®], JANSSEN Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgien).

Es folgte die endotracheale Intubation und Fortführung der Narkose mit Isofluran welches über einen Respirator (AV1, Dräger, Deutschland) in einem Sauerstoff/Luft-Gemisch zugeführt wurde.

Die erforderliche Analgesie wurde durch wiederholte i.v. Gabe von Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,5mg[®], JANSSEN Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgien) erreicht. Die Beatmung über den Respirator (AV1, Dräger, Deutschland) wurde so gesteuert, das zu jeder Zeit der Narkose ein $p_a\text{CO}_2$ von 35 - 45 mmHg und ein $p_a\text{O}_2$ von 90 - 120 mmHg aufrechterhalten wurde.

Zusätzlich wurde die periphere Sauerstoffsättigung mit Hilfe eines Pulsoxymeters bestimmt. Flüssigkeit wurde in Form von 10 ml/kg isotoner Kochsalzlösung bzw. Vollelektrolyt-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zugeführt. Zur Erhaltung einer Normothermie wurde auf dem Operationstisch eine regulierbare Heizmatte platziert. Die Körperkerntemperatur wurde fortlaufend mit einer rektal eingebrachten Sonde überwacht.

Im Folgenden wurde das Fell im Operationsgebiet entfernt, woraufhin die Hautdesinfektion und sterile Abdeckung des Operationsfeldes durchgeführt wurde. Jetzt erfolgte die linksseitige Thorakotomie im 5. Interkostalraum. Die nächste durchgeführte Maßnahme war die Einlage eines 18 Gauge Tygon[®]-Katheter (Norton Performance Plastics, Arkon, Ohio, USA) in die Aorta descendens. Hierzu wurde selbige partiell tangential ausgeklemmt, eine Tabaksbeutelnaht angelegt, die Adventitia entfernt und der Katheter nach Stichinzision eingeführt. Über diesen Zugang wurden später arterielle Blutproben gewonnen, sowie eine kontinuierliche intravasale Blutdruckmessung über einen Transducer durchgeführt.

Es folgte die Eröffnung des Pericards und Platzierung eines Katheters zur Druckmessung im linken Ventrikel (LVP) (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien), über eine weitere Stichinzision im Bereich der Herzspitze, innerhalb des Lumens des linken Ventrikels. Über diesen Katheter war später die Messung des linksventrikulären Druckes (LVP) und die Berechnung dessen erster Ableitung nach der Zeit ($LV d_p / d_t$) möglich.

Die Einlage eines weiteren 18 Gauge Tygon®-Katheters in das linke Herzohr, ebenfalls nach Ausklemmung und Stichinzision, beendete die operative Instrumentierung. Der letztgenannte Katheter diente der Messung des linksatrialen Druckes sowie der Applikation fluoreszierender Mikrosphären.

Die Funktion der eingebrachten Katheter wurde noch intraoperativ überprüft, woraufhin bei guter Funktion das Pericard verschlossen werden konnte.

Die eingebrachten Katheter wurden subcutan zwischen den Scapulae nach außen geführt und dort mit Nahtmaterial fixiert. Wundsekret wurde über eine links thorakale Drainage nach außen abgeleitet. Ergänzend zur postoperativen Schmerztherapie wurden Intercostalblockaden der Intercostalräume 4 bis 6 mit 0,125 % Bupivacain (Carbostesin®, Astra GmbH, Wedel, Deutschland) durchgeführt. Der Thorax wurde im Anschluss schichtweise verschlossen.

Die Wunden wurden mit Betaisodona®- Salbe (Povidon-Jod, Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) bestrichen und mit einer passgenauen Textiljacke verbunden. Infektionen und Beschädigungen der Katheter konnten so in allen Fällen verhindert werden.

Das Versuchstier wurde nach Ausleitung der Narkose unter stabiler Hämodynamik und ausreichender Spontanatmung, sowie mit intakten Schutzreflexen, zurück in seinen Käfig gebracht.

2.3 Postoperatives Management

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe wurde den Tieren mindestens zwölf Tage Zeit gegeben sich von der Operation zu erholen. Am Operationstag sowie am ersten postoperativen Tag wurden die Tiere im Abstand von 3-4 Stunden visitiert. Jede Visite beinhaltete u.a. die i.m. Injektion einer individuell angepassten Dosis Piritramid (Dipidolor®, JANSSEN Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgien) zur Schmerztherapie. Am ersten Tag wurde zusätzlich eine angepasste Dosis Clonidin (Catapressan®, Boehringer Ingelheim, Deutschland) appliziert, um ein postoperatives Durchgangssyndrom zu vermeiden.

Eine Reduktion der Schmerzen auf ein der Operation angemessenes Niveau, sowie gute Führbarkeit des Versuchstieres war auf diese Weise sichergestellt.

Des Weiteren wurde in den ersten drei Tagen nach der Operation, je eine antibiotische Prophylaxe mit 2g Ceftriaxon (Rocephin[®], Hoffmann- La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) durchgeführt. Die Spülung der Katheter mit heparinierter 0,9% NaCl- Lösung, Reinigung und Desinfektion der Wunden, sowie Anlage eines neuen Verbandes erfolgte bis zum dritten Tag täglich. Später wurden diese Maßnahmen einem dreitägigen Rhythmus angepasst.

Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter. Jedes Tier hatte mehrmals täglich Auslauf im Freigehege und stand ununterbrochen unter Beobachtung geschulter Tierpfleger der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universität. Komplikationen konnten so direkt erkannt und der Leiter des Versuchsvorhabens oder dessen Stellvertreter wurden unverzüglich informiert.

3. Versuchsprotokoll

Das Versuchsprotokoll beschreibt das Vorgehen bei 10 Foxhounds im Alter von 11 bis 13 Monaten. Die Tiere waren von beiderlei Geschlecht, das Körpergewicht lag bei 24-28 kg. Bei allen Tieren wurden zu zwei Zeitpunkten Blutentnahmen und eine Bestimmung der Organperfusion durchgeführt. Durch dieses Vorgehen diente jedes Tier als seine eigene Kontrolle.

Vor Beginn der eigentlichen Messungen wurde sichergestellt, dass alle Messsonden korrekt funktionieren und sich die Tiere nach Konnektion an die Messapparatur ruhig verhielten. Das Vorhandensein hämodynamischer Stabilität wurde dokumentiert. Auf Normothermie wurde geachtet. Bei allen Tieren wurde zusätzlich ein peripher-venöser Zugang gelegt, über welchen zur Aufrechterhaltung eines normovolämen Zustandes 2ml/kgKG/h Vollelektrolytlösung infundiert wurden.

Vor Applikation von nor-BNI wurde bei jedem Tier eine komplette Messung zur Bestimmung aller Ausgangswerte durchgeführt. Diese beinhaltete die transthorakale echokardiographische Untersuchung des Herzens, die Applikation des ersten Bolus Mikrosphären (Abschnitt 4.1) zur Bestimmung der regionalen Organperfusion, sowie die Entnahme einer arteriellen Blutprobe zur Bestimmung der Katecholaminspiegel und der endogenen Opioidpeptidspiegel im Plasma, aus dem aortalen Katheter.

Im nächsten Schritt wurde jedem Tier eine Dosis von 2,5 mg/kgKG des selektiven κ -Opioid-Rezeptor Antagonisten nor-BNI über den links-atrialen Katheter zentral infundiert. nor-BNI war, für alle Tiere gleich, in 50ml Aqua-Dest gelöst und wurde mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 30 min. mit konstanter Infusionsgeschwindigkeit gegeben.

Die hämodynamischen Parameter wurden im Verlauf, vom Ende der Substanz Applikation nach: **45 min.**, **60 min.**, **90 min.**, **120 min.**, **150 min.**, **180 min.**, **3,5 Stunden**, **4 Stunden**, **6 Stunden**, **12 Stunden** und **24 Stunden**, jeweils zum Zeitpunkt aufgezeichnet.

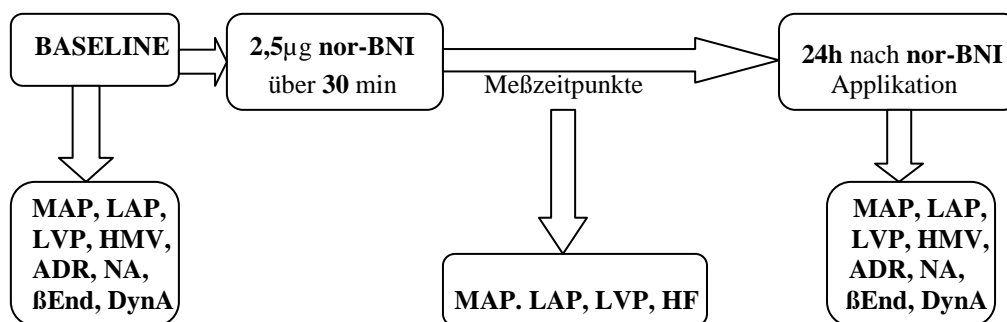
Während der Applikation und in den ersten 4 folgenden Stunden waren die Tiere kontinuierlich unter Aufsicht und an die Überwachungs- und Meßeinheit angeschlossen.

Nach **24** Stunden, zum Zeitpunkt der maximalen und ausschließlich kappa-Rezeptor antagonistischen Wirkung von nor-BNI (Abschnitt 5), erfolgte eine weitere transthorakale echokardiographische Untersuchung, sowie die zweite Applikation fluoreszierender Microsphären, einer anderen Farbe zur Darstellung der regionalen Perfusion zum Zeitpunkt. Ebenfalls nach **24** Stunden wurde erneut eine arterielle Blutprobe zur Bestimmung der Katecholaminspiegel und der endogenen Opioidpeptidspiegel im Plasma, aus dem aortalen Katheter gewonnen.

Zwischen den Meßzeitpunkten wurden die Tiere, ab der 4. Stunde, zurück in Ihre Boxen verbracht. Diese Phase der Erholung verhindert Einflüsse durch Stress und Schlafentzug, bedingt durch die lange Versuchsdauer, auf das Messergebnis.

Der Ablauf aller Messungen und Untersuchungen unterlag einem standardisierten Protokoll. Hierbei wurde neben und hygienischem Arbeiten auch insbesondere darauf geachtet, dass während des gesamten Versuches eine ruhige Atmosphäre im Versuchslabor vorherrschte. Personen, die nicht in den Ablauf involviert waren und den Hunden nicht bekannt waren, hatten zu keinem Zeitpunkt Zutritt. Für die Messungen und Ultraschalluntersuchungen war die Position der Tiere im Versuchskäfig zu allen Zeitpunkten gleich.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs



Die Meßzeitpunkte waren vor dem Versuch (Baseline) und nach nor-BNI Applikation nach 45min, 60min, 120min, 150min, 180min, 3,5h, 4h, 6h, 12h und 24h; MAP=mittlerer Aortaler Blutdruck; LAP=mittlerer linksatrialer Blutdruck; LVP=linksventrikulärer Blutdruck; HMV=Herzminutenvolumen; ADR=Adrenalin; NA=Nor-Adrenalin; βEnd=βendorphin; DynA=Dynorphin A

4. Messmethoden

4.1 Fluoreszierende Mikrosphären

Der regionale Blutfluss (RBF) im Splanchnikusgebiet wurde mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären quantitativ bestimmt. Eine ähnliche Methode, welche auf dem Prinzip der Indikatordilution basiert (Heymann et al., 1977), wurde bereits 1969 und 1976 mit radioaktiv markierten Mikrosphären zur myokardialen Perfusionsbestimmung im Tiermodell verwendet (Domenech et al., 1969; McDevitt et al., 1976) und wurde zunehmend auch zur experimentellen Bestimmung der extrakardialen Organperfusion eingesetzt (Hansen et al., 1998). Der Vergleich von fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären zeigt, dass die radioaktiven Mikrosphären, welche in Dimension und Konzentration den im Versuchsmodell verwendeten fluoreszierenden entsprechen, keinerlei hämodynamische Störungen z.B. durch Embolisation hervorrufen. Zudem wurde bereits gezeigt, dass die Verwendung fluoreszierender Mikrosphären in Ihrer Aussagekraft mit der der radioaktiven Mikrosphären im Hund korreliert (Glenny et al., 1993). Zudem zeigen fluoreszierende Mikrosphären eine geringere Tendenz zur Aggregation und bleiben länger in Lösung. Ein wesentlicher weiterer Vorteil fluoreszierender Mikrosphären ist die ausbleibende Strahlenbelastung. Eine unter das Strahlenschutzgesetz fallende Lagerung und Entsorgung wie bei radioaktiv markierten Mikrosphären entfällt. Auch werden fluoreszierende Mikrosphären nicht durch radioaktiven Zerfall unbrauchbar (Prinzen et al., 1994). Bei allen Vorteilen kann aber eine mögliche chemisch/toxische Gefährdung des Personals oder der Umwelt, bei der Auswertung fluoreszierender Mikrosphären, nicht ausgeschlossen werden.

Die in diesem Modell verwandten Mikrosphären (Nu-Flow Fluorescent Microspheres, Interactive Medical Technologies (IMT), Ltd., Irvine, CA, USA) wurden vor Applikation im Injektionsvolumen (1,8 ml) mit einem Vortex-Mixer aufgeschüttelt und durch ein Ultraschallbad homogen im Injektionsvolumen verteilt.

Pro Versuch waren zwei Applikationszeitpunkte im Protokoll festgelegt, einer vor Verabreichung von nor-BNI sowie ein weiterer 24 Stunden nach Applikation, zum Zeitpunkt der maximal antagonistischen Wirkung am kappa Opioidrezeptor (Endoh et al., 1997).

Bei jeder Applikation wurden $9 \cdot 10^6$ Mikrosphären mit einer Größe von 15 μm über den atrialen Katheter mit gleich bleibender Geschwindigkeit über eine 1 min. injiziert. Der Katheter wurde unmittelbar mit isotonischer körperwarmer Kochsalzlösung gespült, um alle Partikel in den Kreislauf einzubringen.

Die Größe und Unverformbarkeit der Mikrosphären garantiert ein verbleiben im Gefäßbett der einzelnen Organe bei der ersten Kreislaufpassage. Die Anzahl der Mikrosphären in den verschiedenen Geweben ist direkt proportional zu dem jeweiligen Blutfluß. Parallel zur Mikrosphäreninjektion wurde eine Referenzblutprobe über den aortalen Katheter aspiriert. Dies geschah mit Hilfe einer Spritzenpumpe (Havard Apparatus, South Natick, USA) beginnend 10 Sekunden vor und andauernd bis 2 min nach Ende der Injektion, bei konstanter Förderrate von 6,6 ml pro Minute. Der regionale Blutfluss (RBF) der einzelnen Organe lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$\text{RBF} = \frac{\text{Konzentration der Mikrosphären im Organ} * \text{Referenzblutfluss}}{\text{Mikrosphärenkonzentration in der Referenzblutprobe}}$$

Ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf den regionalen Blutfluss der Leber ist hervorzuheben. Durch den Anteil der Leberperfusion aus dem Pfortaderzufluß ist keine valide Aussage über die gesamte Leberperfusion möglich. Im Pfortaderblut sind keine Mikrosphären vorhanden, da diese bereits bei der Passage im intestinalen Gefäßbett abgefangen wurden. (Daemen et al., 1989). Es kann also lediglich der Anteil der Perfusion über die Aa. hepaticae bestimmt werden.

Zur Entnahme der Organproben wurden die Tiere durch Einleitung einer Intubationsnarkose und anschließende Infusion einer 7,46% Kaliumchloridlösung (Kaliumchloridlösung[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) euthanasiert.

Gewebeproben von jeweils 2-3g wurden aus Magenkörper, Magenantrum, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon gewonnen. Im Bereich des Darmes wurden pro Abschnitt jeweils eine proximale und eine distale Probe entnommen. Weitere Proben aus Leber, Milz, Pankreas, Nierenrinde, Nierenmark und Skelettmuskulatur wurden ebenfalls entnommen. Die Proben wurden anschließend mit isotoner Kochsalzlösung von Verunreinigungen befreit und auf ihre äußerliche Unversehrtheit und Homogenität überprüft.

Fettgewebe wurde sorgfältig von den Proben entfernt. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Gewebeproben gewogen und in separate Probenröhrchen verbracht. Die Röhrchen wurden mit Formalin aufgefüllt und mit einem Schraubverschluss verschlossen. Für jede Probe wurde eine Referenznummer vergeben, welche sowohl auf dem Probenröhrchen (lösungsmittelresistent) als auch in der Versuchsdokumentation vermerkt wurde. Zusätzlich wurde von jeder Probe das Brutto- und Nettogewicht dokumentiert. Zur quantitativen Bestimmung der Mikrosphärenkonzentration mittels Flowzytometeranalyse, wurden die Gewebeproben in ein unabhängiges Labor in den USA verschickt (Interactive Medical Technologies (IMT), Ltd., Irvine, CA, USA).

4.2 Bestimmung der Plasmakatecholaminspiegel

Zur Bestimmung der Plasmakatecholaminspiegel wurden arterielle Blutproben beim ruhenden Tier unmittelbar vor Applikation von nor-BNI und 24 Stunden nach Applikation der Testsubstanz über den aortalen Katheter aspiriert. Es wurden jeweils 5 ml Blut in gekühlte Polystyren-Röhrchen abgenommen, welche reduziertes Gluthadion (GSH) und EGTA enthielten (KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland).

Die Blutproben wurden unmittelbar für 20 min bei 4°C mit 3000 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde abpipettiert und bei -70°C bis zur Analyse tiefgefroren.

Die Bestimmung der Katecholamine Adrenalin (ADR) und Noradrenalin (NA) wurde mit Hilfe eines Hochleistungsflüssig-Chromatographen (HPLC-Technik) durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml Plasma mit Pufferlösungen eines kommerziell zu erwerbenden Extraktions-Essay gewaschen (Chromosystems, München, Deutschland).

Zur selektiven Isolation der Katecholamine durch Adsorption wurde die Waschlösung über Säulen aus Aluminiumoxid geleitet (Maycock et al.; 1987). 40 µL der Elution wurden im nächsten Arbeitsgang in einen Kontron 422 Flüssigchromatographen (Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland) pipetiert. Verbunden war der Chromatograph mit einem elektrochemischen Detektor Modell 4001 (Chromosystems, München, Deutschland), dessen gläserne Karbonarbeitselektrode auf eine Spannung von 0.5 V gegenüber der Silberchlorid Referenzelektrode eingestellt war. Die untere Detektionsgrenze war definiert als 95% des oberen Plateaus der Standardkurve, entsprechend 10pg/ml für ADR und NA. Der intraassay Variationskoeffizient betrug 5,4% für ADR und 5,8% für NA. Der interassay Variationskoeffizient lag bei 10,6% für ADR und 9,4% für NA.

4.3 Bestimmung endogenen Opioidpeptidspiegel im Plasma

Im Rahmen der hier vorgestellten Versuche wurden die Plasmakonzentrationen von Dynorphin A, einem endogenem κ -Opioidrezeptor Agonisten, und β -Endorphin einem endogenen μ -Opioidrezeptor Agonisten, bestimmt (Grosse-Hartlage et al.; 2002). Die Proben von je 7,5 ml wurden in vorgekühlte Probenröhrchen, die als Zusatz EDTA und 500 IU/ml Blut Aprotinin (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) enthielten, abgenommen. Bei 3000 U/min wurde die Probe über einen Zeitraum von 20 min bei 4°C zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und anschließend bei -70°C bis zur Analyse gelagert. Die spätere Bestimmung der endogenen Opioidpeptide wurde von einem unabhängigen Labor (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) vorgenommen.

Die untere Detektionsgrenze lag bei 3,1 pg/ml für β -Endorphin und bei 8 pg/ml für Dynorphin. Der interassay und intraassay Variationskoeffizient lag sowohl für β -Endorphin als auch für Dynorphin A bei unter 5%. Die Proben der Ausgangswertbestimmung und der Bestimmung nach 24 Stunden wurden, für β -Endorphin als auch für Dynorphin A, in jeweils dem gleichen Radioimmunassay bestimmt. Die Plasmakonzentrationen aller Proben wurde zweifach bestimmt und das Mittel als Ergebnis angenommen. Um einen Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf die Plasmakonzentrationen zu vermeiden, wurden alle Versuche zwischen 8:00 und 9:00 am Vormittag begonnen.

4.4 Bestimmung hämodynamischer Parameter

4.4.1 Messung des intraaortalen Druckes (MAP)

Zur Druckmessung wurde ein 18 Gauge Tygon[®]- Katheter nach Stichinzision in der Aorta descendens platziert. Der blasenfrei mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Katheter wurde an ein steriles Einmaltransducersystem (Becton Dickinson Critical Care Systems, Utah, USA) angeschlossen. Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung des Systems an Luftdruck und Temperatur im Versuchslabor. Der Transducer wurde exakt auf Herzhöhe des Tieres platziert.

4.4.2 Messung des linksatrialen Druckes (LAP)

Zur Druckmessung wurde ein weiterer 18 Gauge Tygon[®]- Katheter nach Ausklemmen und Stichinzision im linken Herzohr platziert. Der ebenfalls blasenfrei mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Katheter wurde an ein steriles Einmaltransducersystem (Becton Dickinson Critical Care Systems, Utah, USA) angeschlossen. Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung des Systems an Luftdruck und Temperatur im Versuchslabor. Der Transducer wurde exakt auf Herzhöhe des Tieres platziert.

4.4.3 Messung des linksventrikulären Druckes (LVP)

Die Druckmessung erfolgte kontinuierlich über einen im Bereich der Herzspitze nach Stichinzision in das linksventrikuläre Cavum positionierten Druckwandler („Pressure- Microtransducer“). Der Katheter kann nach Implantation im Versuchstier kalibriert werden. Für diese Methode ist ein linearer Kurvenverlauf bei guter Nullstabilität sowohl für die Anwendung *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. Eine sichere Funktion ist für mindestens drei Monate gegeben (Smet et al.; 1979). Vor jedem Versuch erfolgte zudem eine Kreuzkalibrierung gegen den MAP und LAP.

4.4.4 Bestimmung der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit

Durch elektronische Aufzeichnung der LVP-Druckkurve über die Zeit konnte die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (LVdp/dt) bestimmt werden. Hierzu wurde der Kurvenverlauf des LVP- Signals im Computer elektronisch differenziert. Die mittlere Steigung des Kurvenverlaufes entspricht der Druckanstiegsgeschwindigkeit.

4.5 Echokardiographische Untersuchung des Herzens

Gewählt wurde für diese Methode ein HP Sonos[®] 5500 Ultraschallgerät kombiniert mit einem 2-4 Mhz Fusion-Imaging Schallkopf. Die Versuchstiere wurden in dem oben beschriebenen Käfig, an welchen sie gewöhnt waren, untersucht und waren so maximal ruhig. Zur besseren Schallübertragung wurde der Thorax im Areal der Untersuchung rasiert. Die Untersuchung erfolgte unter gleichzeitiger Ableitung eines Elektrokardiogramms (EKG) zur Bestimmung der Herzfrequenz (HR).

Um eine exakte Darstellung des Ventrikellumen - Endokard - Übergangs zu erreichen, kam bei dieser Fragestellung, mit Aufzeichnung eines zweidimensionalen Bildes, die sog. Second - Harmonic - Imaging - Technik mit Sendefrequenzen von 1.8 Mhz und Empfangsfrequenzen von 3,6 Mhz zum Einsatz.

Durch Akustische Quantifizierung in Kombination mit Echt - Zeit Berechnung des enddiastolischen und endsystolischen Volumens aus dem zweidimensionalen Bild, konnte die globale Ejektionsfraktion (EF) jederzeit während des Versuches bestimmt werden.

Das Herzminutenvolumen konnte rechnerisch anhand von EF und HR bestimmt werden. Alle gemessenen Parameter wurden auf S - VHS Video und magnetoptischer Platte gespeichert. Die Untersuchung wurde von einem in dieser Untersuchungstechnik erfahrenen Facharzt für Kardiologie durchgeführt. Dieser hatte zu keinem Zeitpunkt Auskunft darüber, ob es sich um ein Tier vor oder nach Substanzapplikation handelt. Um interindividuelle Messfehler zu vermeiden wurde die Untersuchung immer von einem, den Hunden vertrauten, Kollegen durchgeführt.

Die erste Untersuchung wurde vor Applikation von nor-BNI unter Ausgangsbedingungen (Baseline) durchgeführt.

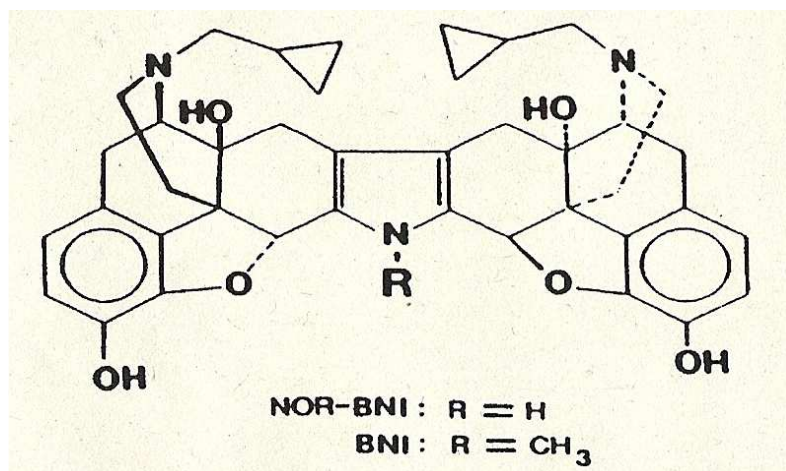
Eine weitere 24 Stunden nach Ende der Applikation, zum Zeitpunkt des Wirkmaximums des κ -Opioidrezeptorantagonisten

5. Untersuchtes Pharmakon – nor-Binaltorphimin

Die Wirkung von Opioiden wird nach deren Bindung an spezifische Rezeptoren der Untergruppen μ (mü), κ (kappa) und δ (delta) (Dhawan et al., 1996) vermittelt. Einige Opioidrezeptorliganden sind in der Lage an verschiedene Rezeptortypen nebeneinander zu binden, so z. B. das exogene Opiat Morphin, während das endogene Opioidpeptid Dynorphin hauptsächlich an den κ -Rezeptor und β -Endorphin am μ -Rezeptor bindet. Andere Substanzen wiederum zeigen ein breites unselektives Bindungsspektrum mit antagonistischer Wirkung, wie zum Beispiel die synthetische Substanz Naloxon. Opiat und Opioid Bindungen an Opioidrezeptoren haben meist reversiblen Charakter und können durch kompetitiven Antagonismus aus Ihrer Bindung verdrängt werden. Die Affinität einer Substanz kann sich hierbei an den Opioidrezeptorsubtypen unterscheiden. Der κ -Opioidrezeptor wurde in den Mittelpunkt der der Untersuchung gestellt, da der selektive κ -Opioidrezeptor Agonist Dynorphin-(1-13) in der Studie von Allescher (Allescher et al.; 1988) den stärksten inhibitorischen Effekt zeigte. Da nicht sicher vorhergesagt werden kann, ob die Wirkung eines selektiven Opioid-Rezeptor Antagonisten auf Hämodynamik und regionale Organperfusion zentral oder peripher vermittelt ist, war es Bedingung, eine sowohl zentral, als auch peripher wirksame Substanz zum Einsatz zu bringen.

Die in diesem Versuch verwandte Substanz nor-Binaltorphimin kann die Blut-Hirn Schranke passieren, und ist sowohl zentral als auch peripher wirksam. Der erwünschte κ -Opioidrezeptor Antagonismus von nor-BNI ist weiter höchst selektiv (Portoghese et al., 1987). Einige Studien berichten auch von μ -Rezeptor antagonistischer Wirkung, welche ihr Maximum aber bereits nach 30-60 Minuten erreicht. Nach 4 Stunden ist die μ -antagonistische Wirkung nicht mehr nachweisbar (Endoh et al., 1992). Seine maximale und ausschließlich kappa-Rezeptor antagonistische Wirkung entfaltet nor-BNI 24 Stunden nach i.v. Applikation, wobei die Wirkung bis zu 4 Wochen nachweisbar sein kann (Endoh et al., 1992). Wichtig ist auch, dass es sich bei nor-BNI nicht um ein Protein handelt, das allergische Potenzial ist somit als sehr gering einzustufen.

Abbildung 2: nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



6. Datenerfassung und Statistik

Die kontinuierlich erfassten Parameter wie MAP, LAP und Herzfrequenz wurden im Echtzeitverfahren elektronisch verarbeitet. Als Hardware stand ein Apple Power Macintosh 8500/120 mit der notwendigen Erweiterung zur online-Datenerfassung zur Verfügung. Als Software diente Labview 4.0 (National Instruments Germany GmbH, München, Deutschland). Auf CD-ROM wurden die erfassten Daten dauerhaft gespeichert. Die Blutgasanalysen erfolgten mit Hilfe eines Analysators mit Oxymeter (ABL 520, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Auch diese Ergebnisse wurden in Datenerfassungsbögen eingetragen.

Mit handelsüblichem Computersystem (Apple, Cupertino, USA) und Software (Microsoft Excel, Statview) wurde die Auswertung der Daten vorgenommen.

Durch den Vergleich verschiedener Messzeitpunkte sollten Behandlungsunterschiede und Therapieeffekte herausgearbeitet werden. Zur statistischen Auswertung wurde daher eine sogenannte „one-way analysis of variance“ für wiederholte Messungen und ein T-Test für abhängige Stichproben verwandt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm der zugehörigen Standardabweichung (SD) dargestellt. Für alle Messwerte lag eine Normalverteilung vor.

7. Ergebnisse

7.1 Hämodynamik

Das Herzminutenvolumen (HMV) der Tiere unter den Ausgangsbedingungen (=Baseline) lag bei $2,83 \pm 0,29$ Litern pro Minute. Die Daten waren normal verteilt.

Die Herzfrequenz (HF) betrug unter Baselinebedingungen (BL) durchschnittlich 105 ± 13 bpm, der aufgezeichnete aortal gemessene Blutdruck (MAP) 99 ± 9 mmHg und der mittlere links atriale Blutdruck betrug $2,1 \pm 0,5$ mmHg.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

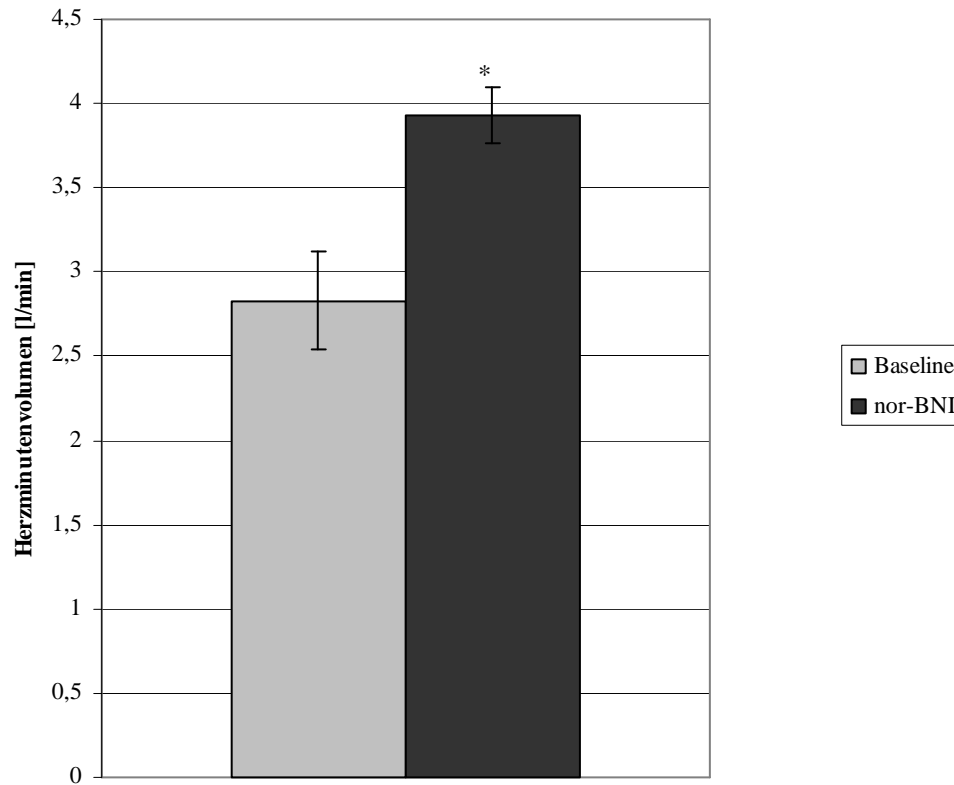
Tabelle 1: Hämodynamikdaten der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v.Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)

	HMV [l/min]	HF [bpm]	MAP [mmHg]	LAP [mmHg]
Baseline	$2,83 \pm 0,29$	105 ± 13	99 ± 9	$2,1 \pm 0,5$
nor-BNI	$3,93 \pm 0,17^*$	106 ± 11	96 ± 11	$2,3 \pm 0,4$

* $p < 0,05$ vs. BL; n=10; Mittelwert \pm SD; HMV=Herzminutenvolumen; HF=Herzfrequenz; MAP=mittlerer aortaler Blutdruck, LAP=links atrialer Blutdruck

Nach κ -Opioidrezeptorblockade mit nor-BNI kam es gegenüber den Baselinemessungen, zu einem signifikanten Anstieg des HMV auf $3,93 \pm 1,71$ l/min (Abbildung 2).

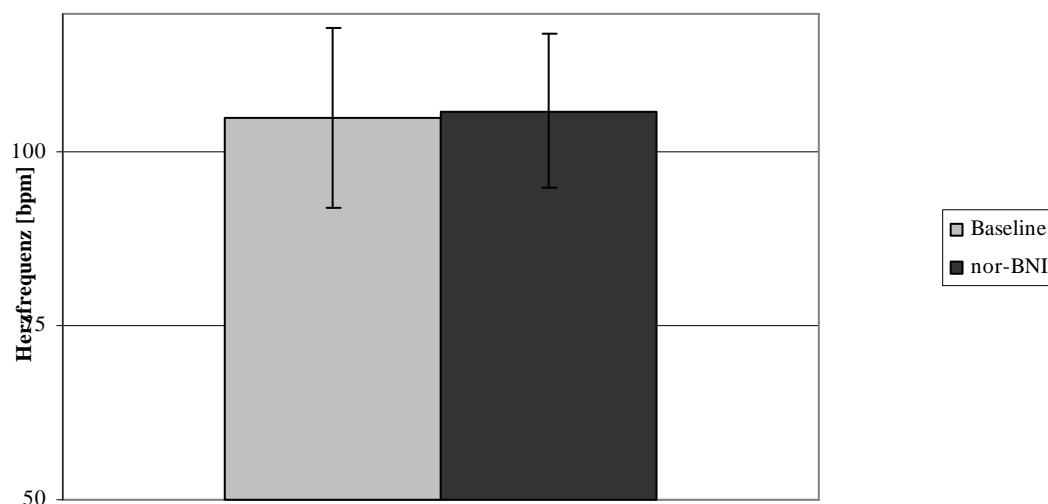
Abbildung 3: Herzzeitvolumen der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



*p=0,05 vs. BL; n=10; Mittelwert \pm SD

nor-BNI hatte 24h nach seiner i.v.-Gabe keine signifikanten Änderungen der Herzfrequenz (HF) zur Folge (Abbildung 3).

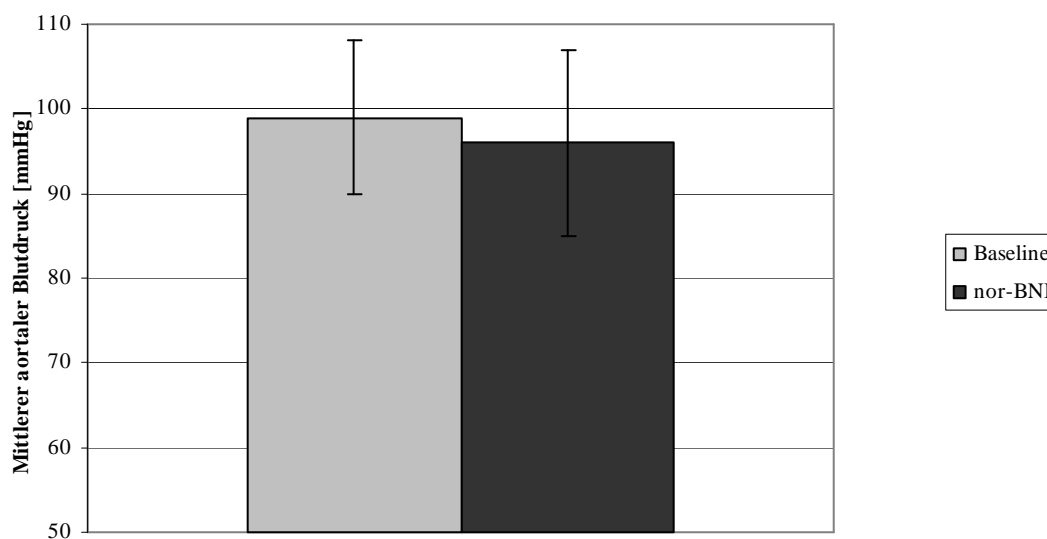
Abbildung 4: Herzfrequenz der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



M=10; MW \pm SD

Der mittlere aortale Blutdruck (MAP) betrug durchschnittlich 96 ± 11 mmHg. Die i.v. Applikation von nor-BNI hatte nach 24h keine signifikante Abweichung zur Folge (Abbildung 4).

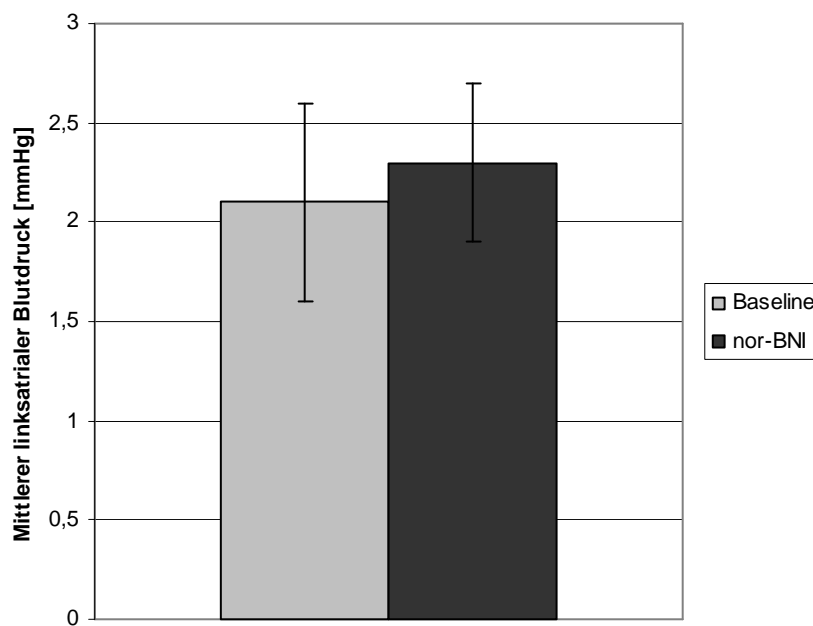
Abbildung 5: Mittlerer aortaler Blutdruck der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



M=10; MW \pm SD

Der mittlere linksatriale Blutdruck (LAP) betrug durchschnittlich $2,1 \pm 0,5$ mmHg. Die i.v. Applikation von nor-BNI hatte nach 24h keine signifikante Abweichung zur Folge (Abbildung 5).

Abbildung 6: Mittlerer linksatrialer Blutdruck der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



M=10; MW \pm SD

7.2 Regionaler Blutfluss

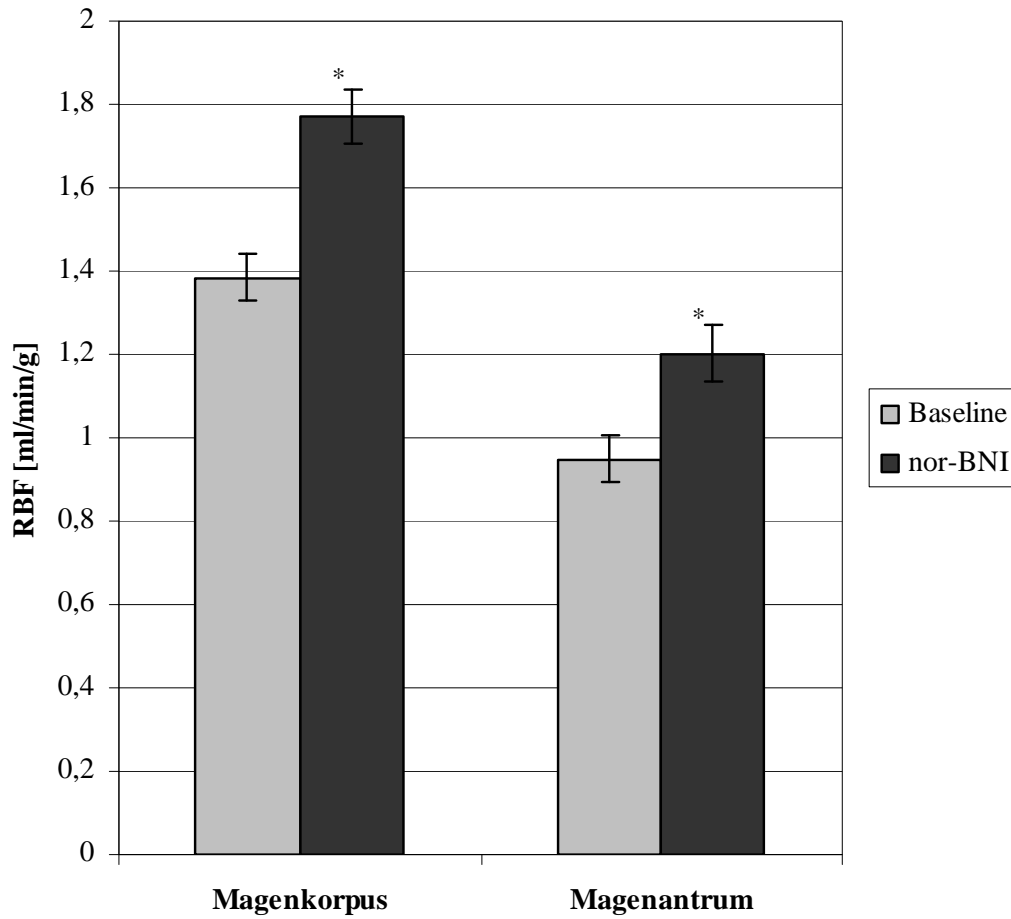
Der arterielle regionale Blutfluss (RBF) wurde mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären bestimmt (Abschnitt 4.1). Die Maßeinheit für den RBF ist $[\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$. Wie aus *Tabelle 2* ersichtlich, kam es 24h nach i.v. Applikation von nor-BNI zu einer signifikanten Erhöhung des RBF in Magenkorpus, Magenantrum, Duodenum, proximalem und distalem Jejunum, distalem Ileum, proximalem und distalem Kolon, Pankreas, Nierenrinde und Nierenmark. Unbeeinflusst blieb der arterielle RBF der Leber und der RBF des proximalen Ileum. Der RBF der Milz und der Skelettmuskulatur waren, gegenüber den Baselinewerten, signifikant verringert (*Tabelle 2*).

Tabelle 2: Regionaler Blutfluss (RBF) ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)

	RBF [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$]		RBF [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$]	
	Baseline		nor-BNI	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Magenkorpus	1,385	0,049	1,77	0,066*
Magenantrum	0,95	0,058	1,202	0,023*
Duodenum	0,571	0,01	0,815	0,068*
prox. Jejunum	0,25	0,032	0,495	0,049*
dist. Jejunum	0,307	0,021	0,419	0,033*
prox. Ileum	0,796	0,074	0,704	0,067
dist. Ileum	0,513	0,053	0,641	0,043*
prox. Kolon	0,706	0,048	0,815	0,054*
dist. Kolon	0,735	0,01	0,983	0,035*
Leber	0,15	0,017	0,128	0,014
Milz	2,878	0,326	1,578	0,14*
Pankreas	2,863	0,362	3,507	0,097*
Nierenrinde	4,367	0,498	6,303	0,881*
Nierenmark	0,301	0,027	0,625	0,056*
Muskulatur	0,442	0,029	0,067	0,005*

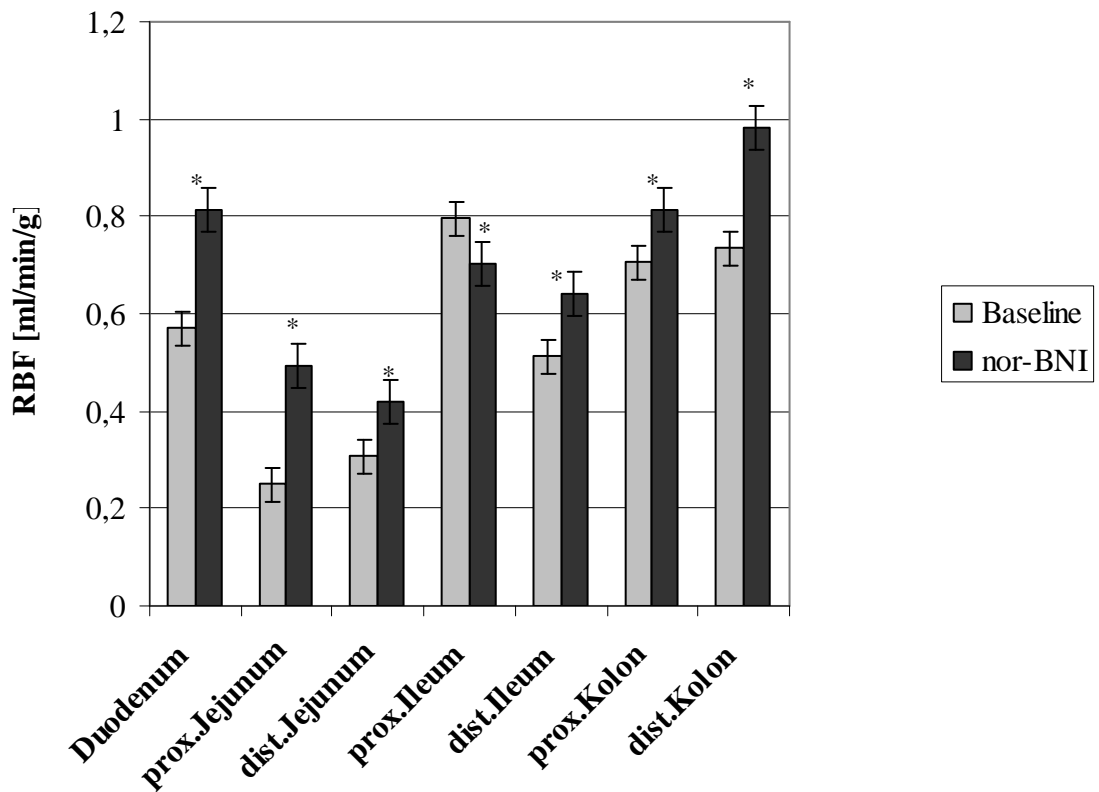
*p=0,05 vs.BL; n=10;Mittelwert \pm Standarddeviation (SD); prox=proximal; dist=distal

Abbildung 7: Regionaler Blutfluss des Magens der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



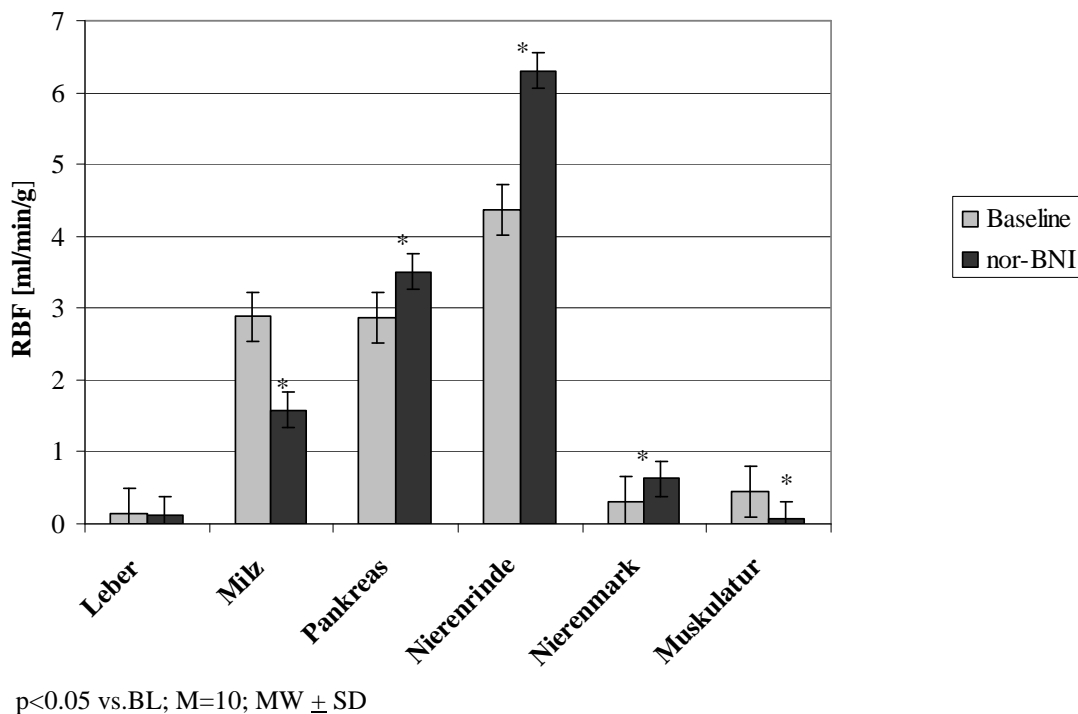
M=10; MW \pm SD; *p<0,05 vs.BL

Abbildung 8: Regionaler Blutfluss des Intestinums der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



* $p < 0.05$ vs. BL; M=10; MW \pm SD; prox=proximal; dist=distal

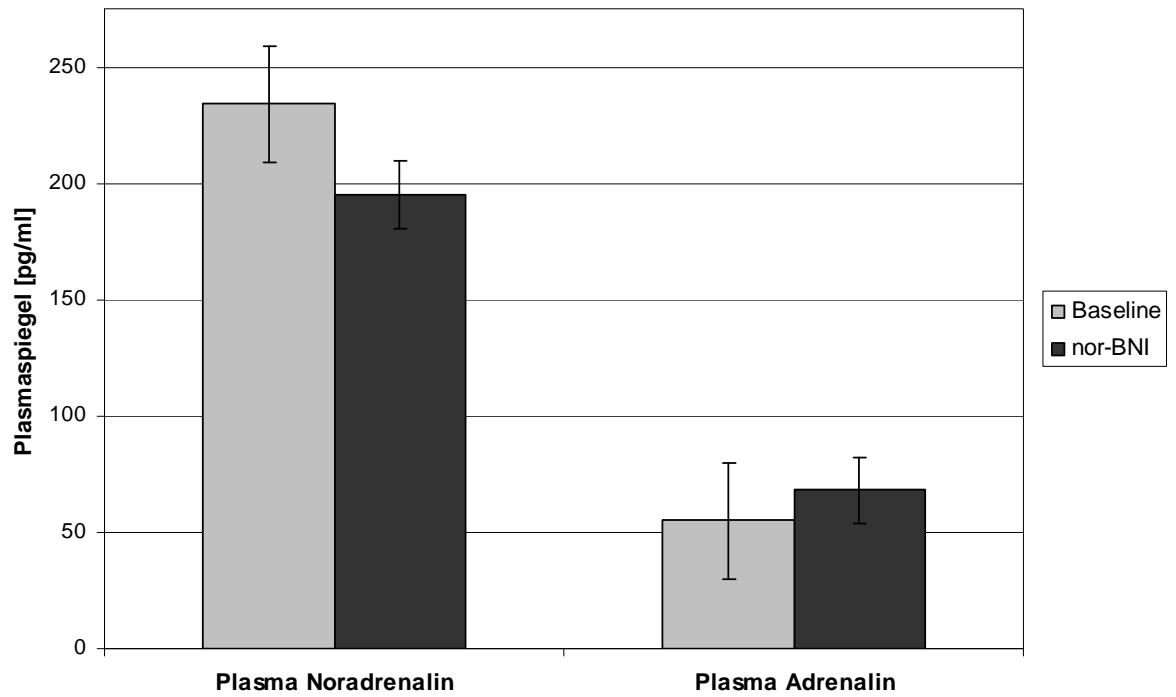
Abbildung 9: Regionaler Blutfluss einzelner Organsysteme der wachen Hunde ohne (Baseline) und 24h nach i.v. Applikation von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



7.3 Arterielle Plasmaspiegel von Adrenalin und Noradrenalin

Der basale arterielle Noradrenalin (NA) Plasmaspiegel (Baseline) wurde von einem beauftragtem Labor bestimmt (Abschnitt 4.2), ebenso wie der basale Plasmaspiegel von Adrenalin (ADR). Die Maßeinheit ist pg/ml. Die 24h nach i.v. Applikation von nor-BNI gemessenen arteriellen Plasmakatecholaminspiegel zeigten keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Baselinewerten (Abbildung 9).

Abbildung 10: Plasmakatecholaminspiegel unter Baselinebedingungen (Baseline) und 24h nach i.v. Gabe von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)

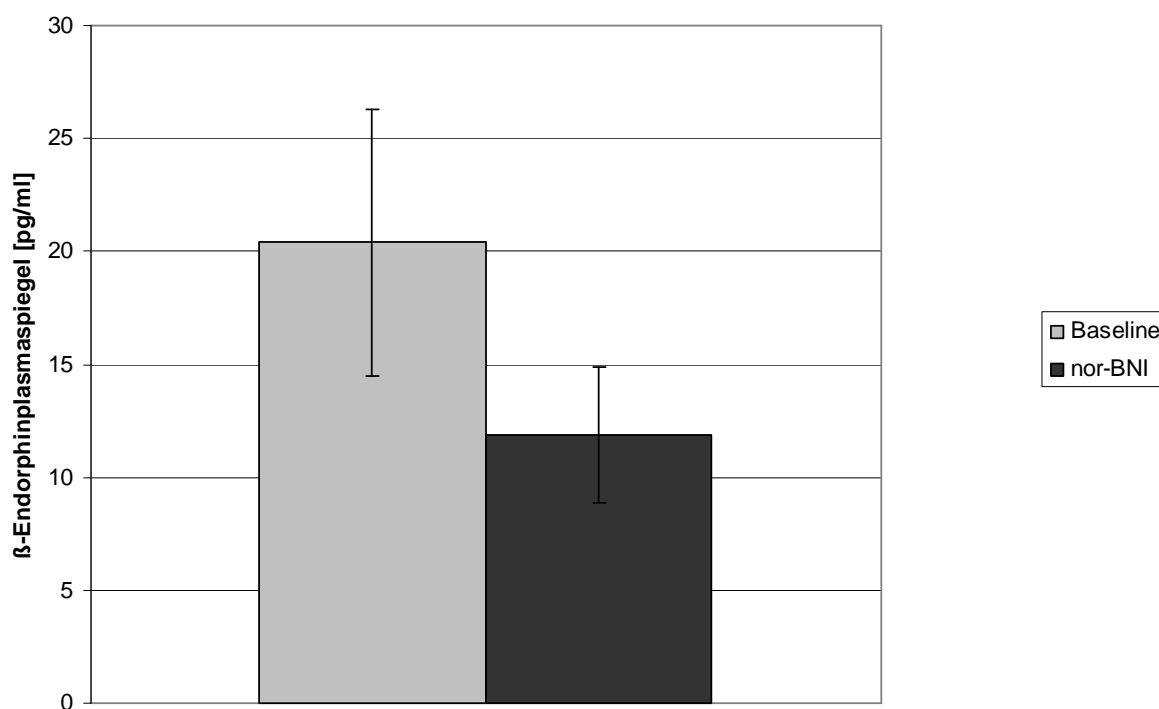


M=10; MW \pm SD

7.4 Arterielle Plasmaspiegel von Dynorphin A und β -Endorphin

Der basale arterielle Plasmaspiegel von β -Endorphin wurde mit $20,4 \pm 5,9$ pg/ml unter Ausgangsbedingungen (Baseline) bestimmt 24h nach i.v. Applikation von nor-BNI lag der Wert bei $11,9 \pm 3,0$ pg/ml. Die Werte zu den beiden Meßzeitpunkten unterscheiden sich nicht signifikant (Abbildung 10).

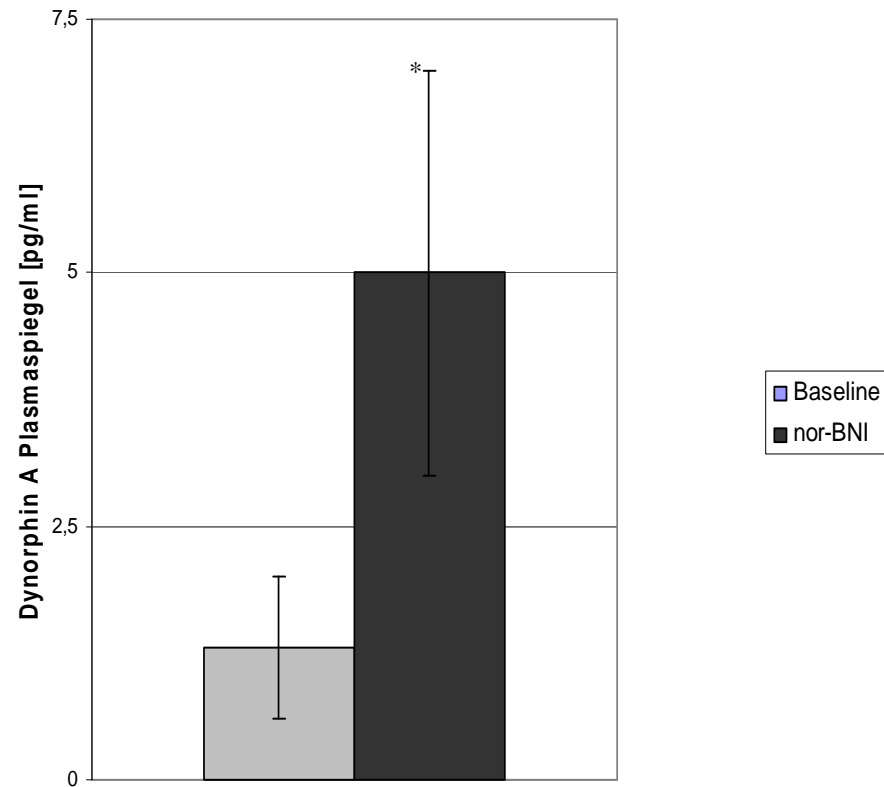
Abbildung 11: β -Endorphin Plasmaspiegel unter Baselinebedingungen (Baseline) und 24h nach i.v. Gabe von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



M=10; MW \pm SD

Die basale Dynorphin A Bestimmung ergab einen arteriellen Plasmaspiegel von $1,3 \pm 0,7$ pg/ml unter Baselinebedingungen. Nach 24 Stunden zeigte sich ein signifikant höherer Plasmaspiegel von $5,0 \pm 2,0$ pg/ml (Abbildung 11).

Abbildung 12: Dynorphin A Plasmaspiegel unter Baselinebedingungen (Baseline) und 24h nach i.v. Gabe von nor-Binaltorphimin (nor-BNI)



$p < 0.05$ vs. BL; $M = 10$; $MW \pm SD$

8. Diskussion

8.1 Einleitung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nor-BNI den RBF im Splanchnikusgebiet signifikant steigert. Bedeutsam ist eine gleichzeitige signifikante Steigerung des HMV bei nicht signifikant erhöhter Herzfrequenz und nicht signifikant erhöhtem MAP. Folglich ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass nor-BNI durch κ -Opioidrezeptor Blockade am Herzen zu einem positiv inotropen Effekt, und am Intestinum zur Vasodilatation führt. Bestätigung findet diese Beobachtung durch die Beobachtung einer Umverteilung des RBF vom Skelettmuskel, zugunsten des Splanchnikusgebietes.

8.2 Diskussion des Versuchsmodells

Das gewählte Versuchsmodell hat sich in bisherigen Arbeiten zu hämodynamischen Fragestellungen (Grosse Hartlage et al., 2004) und Fragestellungen der Perfusion bewährt (Weber et al., 2002). Vergleicht man Untersuchungen an Geweben in vitro mit denen im lebenden Organismus, so ist festzustellen das sich bei in vitro Experimenten zwar eine isolierte Organstruktur oder funktionelle Einheit gezielt untersuchen lässt (Hartung et al., 1993), der für klinisch relevante Aussagen aber unerlässliche Einfluss des Vegetativum und der humoralen Faktoren auf das Organsystem aber unberücksichtigt bleibt. Folglich sind in vivo Experimente v.a. im chronischen Tiermodell immer noch unerlässlich (Festing et al., 2002; Hartung et al., 1998; Johnson et al., 2002). Für das Versuchsmodell in vivo ist weiterhin zu beachten, dass die Reaktionen des Organismus unter Versuchsbedingungen möglichst störungsfrei erhalten werden müssen, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Faktoren wie z.B. Stress zu vermeiden (Johnson et al., 2002). Durch die einfach durchzuführende Konditionierung auf einen experimentellen Versuchsaufbau erscheint der Hund als geradezu ideal.

Hinzu kommt eine Eignung in nahezu idealer Weise durch wesentliche Ähnlichkeiten des Hundeorganismus mit dem des Menschen auf kardiovaskulärer (Hasenfuss et al., 1998), endokrinologischer (Rijberk et al., 2003) und pathophysiologischer (Brown et al., 2004) Ebene.

Besonders wichtig für das hier beschriebene Modell ist die Ähnlichkeit des Opioidsystems des Hundes mit dem menschlichem (Odendaal et al., 2003). Die Auswahl eines chronischen Versuchmodells für unsere Versuche mit einer Erholungsphase der Tiere von mindestens 12 Tagen nach operativer Instrumentierung, verspricht eine höhere Validität der Ergebnisse und einen Versuchsorganismus unter physiologischeren Bedingungen, da kein perioperativer Stress die Physiologie des Tieres beeinflusst (Triana et al., 1991). Bei akuter Instrumentierung, bei welcher die Messungen direkt im Anschluss an die operative Instrumentierung vorgenommen werden, ist mit einem Einfluss der Narkose (Luna et al., 2001) und der Intervention selber (Priebe et al., 1988) auf die Messergebnisse zu rechnen.

Trotz aller Ähnlichkeit ist aber immer zu bedenken, dass es sich um ein Modell innerhalb einer anderen Spezies handelt. Diese Erkenntnis muss bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse bedacht werden. Die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist deshalb nach wie vor nicht möglich (Brent et al., 2004).

8.3 Physiologie, Regulation und Interaktion der Splanchnikusperfusion

Das Splanchnikusareal setzt sich aus den zugeordneten Organen Magen, Darm, Leber, Pankreas und Milz zusammen. Um eine differenziertere Beurteilung zu ermöglichen wurde für unsere Versuchsreihe eine weitergehende Aufteilung vorgenommen, hierbei wurde der Magen in Korpus und Fundus unterteilt. Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon wurden in ihren proximalen und distalen Anteil unterteilt. Weiter wurde das klassische Splanchnikusareal um die Betrachtung der Niere, mit Aufteilung in Rinde und Mark, sowie um eine Skelettmuskelprobe des Musculus Glutaeus maximus ergänzt.

Der RBF des Magens, der Leber und der Milz wird aus Ästen des Truncus coeliacus aufrechterhalten. Duodenum, Jejunum, Ileum und 2/3 des proximalen Kolon werden arteriell durch die Arteria mesenterica superior versorgt. Die Arteria mesenterica inferior versorgt schließlich den distalen Anteil des Kolon.

Der RBF der Leber setzt sich zusammen aus dem Blutfluss der Vena portae und der Arteriae hepaticae. Der Zufluss der Vena portae erhält hierbei Blut aus dem Kapillarnetz von Magen, Darm, Milz, Pankreas und Mesenterium. Das Pankreas wird durch Äste der Arteria splenica, der Arteria gastroduodenalis sowie der Arteria mesenterica superior versorgt. Die arterielle Versorgung der Nieren wird durch die aus der abdominalen Aorta entspringenden Arteriae renalis gesichert. Annäherungsweise 30% des Herzzeitvolumen (HMV) werden für den RBF des Splanchnikusgebietes benötigt.

Das gesamte Gebiet ist von einem dichten Geflecht an sympathischen und parasympathischen Nervenfasern durchzogen, welche einen großen Anteil an der Regulation des RBF, durch Beeinflussung des Tonus an Arteriolen und Präkapillaren, haben. So werden sympathische Signale durch Freisetzung von Noradrenalin, parasympathische durch Acetylcholinfreisetzung übertragen. Die adrenerge Innervation durch den Sympathikus reguliert dabei hauptsächlich den RBF (Parker et al., 1999) auf Ebene der Arteriolen und Präkapillaren. Zusätzlich regulativen Einfluss auf den RBF (Hansen et al., 2003) hat das enterische Nervensystem, bestehend aus Plexus myentericus (Auerbach) – lokalisiert zwischen den Schichten der Tunica muscularis, sowie dem Plexus submucosus (Meissner) – angeordnet in der Submucosa.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Regulationsmechanismen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der endogenen Opioidpeptide an der Regulation der Splanchnikusperfusion (Wallus et al., 1981).

8.4 Das endogene Opioidpeptid System

Das endogene Opioidsystem setzt sich aus drei verschiedenen Peptiden zusammen: Endorphine (Li et al., 1976), Enkephaline (Hughes et al., 1975) und Dynorphine (Goldstein et al., 1979) wobei jedes Peptid aus einer eigenen Vorstufe synthetisiert wird, Proopiomelanocortin, Proenkephalin und Prodynorphin. Die Signalkaskade ist rezeptorvermittelt G-Protein gekoppelt, wobei Interaktionen von Rezeptorsubtypen untereinander beschrieben sind. Diese können in der Wirkung sowohl synergistisch als auch gegeneinander gerichtet sein. Es können Rezeptoren sowohl im gleichen Gewebe, direkt physikalisch oder durch interzelluläre Signalkaskaden, als auch in verschiedenen Geweben durch im Blut gelöste Botenstoffe interagieren. (Smith et al., 2003). Die Hauptbindungsstellen der drei Opioidpeptide sind der μ - (Chen et al., 1993), δ - (Evans et al., 1992) und κ -Rezeptor (Yasuda et al., 1993).

Die Peptide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Affinitäten zu den Rezeptoren wobei Dynorphin A bevorzugt am κ -Rezeptor und β -Endorphin am μ -Rezeptor bindet. Erst vor einigen Jahren wurden weitere Peptide, Endomorphin (Zadina et al., 1997) und Orphanin FQ (Reinscheid et al., 1995), entdeckt.

Die Aktivierung des endogenen Opioidsystems ist eng mit der Aktivierung des sympathischen Nervensystems verbunden. Auch hier erfolgt eine Aktivierung hauptsächlich bei Stress, Schmerzen und Angst (Nieber et al., 1985), entwicklungsgeschichtlich als Flucht- oder Kampfreaktion (Akil et al., 1984). Nach heutigem Kenntnisstand werden nahezu alle Bereiche des Organismus durch endogene Opioide beeinflusst (Burks et al., 1987). So werden endogene Opioide im zentralen Nervensystem u.a. in Hypophyse, Hypothalamus, dem limbischen System, den Raphekernen und im Rückenmark expremiert. Peripher sind u.a. Schilddrüse, Pankreas, Nebennieren, Herz und der Gastrointestinaltrakt zu nennen. Die Ausschüttung erfolgt hierbei sowohl zentral als auch peripher. So bindet z.B. β -Endorphin an δ -Rezeptoren des Hypothalamus, was zu einer verminderten Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin aus den Nebennieren führt, und ein Grund für die schlechte Hämodynamik im Schock ist. Das Wirkspektrum der endogenen Opioide kann hierbei als modulierend der Sympathikuswirkung entgegengesetzt beschrieben werden (Wong et al., 1990).

Im Gastrointestinaltrakt findet sich eine starke Variation der Rezeptorverteilung für endogene Opioide. Schon 1981 wurde die Expression von Opioidrezeptoren im Magen bei Hunden diskutiert (Walus et al.; 1981). Inzwischen konnte immunhistochemisch eine große Dichte an κ - und μ -Rezeptoren in Magen und proximalem Kolon der Ratte gefunden werden. Die Expressionsdichte des κ -Rezeptors war im proximalen Kolon viermal größer als die des μ -Rezeptors. Im Duodenum war die geringste Rezeptordichte zu finden (Fickel et al., 1997). Auch konnte eine hohe Dichte an opioidpeptiden sowie deren Rezeptoren sowohl im Plexus sumukosus (Watson et al., 1981) als auch im Plexus myentericus (Jessen et al., 1980) gefunden werden. Hierbei ist der κ -Rezeptor hauptsächlich im Plexus myentericus lokalisiert, während der δ -Rezeptor und der μ -Rezeptor sowohl im Plexus myentericus als auch im Plexus submucosus gefunden werden (Sternini et al., 2001).

Die Zusammensetzung der exprimierten Peptide ist dabei spezies- und gewebespezifisch, kann aber selbst innerhalb des gleichen Gewebetyps variieren (Rattenbacher et al., 2001).

8.5 Der Einfluss auf die Inotropie des Herzens

Für das Herz, und speziell im Hinblick auf die Inotropie konnten vorangegangene Studien die Expression des κ -Rezeptors am Herzen beweisen (Tai et al., 1991) und die Modulation der kardialen Funktion durch κ -Agonisten belegen (Wong et al., 1990). Weiter scheint die Aktivierung des κ -Opioidrezeptors zu einer negativen Inotropie zu führen. Dieser Effekt konnte schon in anderen Studien mit unselektivem Opioidrezeptorantagonismus in vivo (Caffrey et al., 1985) wie auch in vitro unter Verwendung des κ -Opioidrezeptor Agonisten U-50,488H (Kasper et al., 1992) beschrieben werden. Als Mechanismus scheint eine Kalzium Verarmung, im sarkoplasmatischen Retikulum der Myozyten, bei Stimulation des κ -Rezeptors am Herzen zugrunde zu liegen (Ventura et al., 1992).

8.6 Der Einfluss auf die Motilität des Intestinums

Die motilitätshemmende Wirkung von Opiaten am Intestinum ist seit langem bekannt, so wird u.A. der Wirkstoff Loperamid in der Behandlung der Diarrhö eingesetzt (Muller et al., 2003).

Unter der Wirkung von Opioiden ist die gastrale Entleerung verzögert (Sullivan et al., 1981) und die intestinale Passage prolongiert (Fiocchi et al., 1982). Der direkte Einfluss der einzelnen endogenen Opioiden auf die intestinale Motilität wurde 1988 in einem Tierversuchsmodell mit synthetisch hergestellten selektiven Opioidrezeptor Agonisten beschrieben (Allescher et al., 1988) wobei Dynorphin-(1-13) dosisabhängig den stärksten hemmenden Einfluss auf die intestinale Motilität zeigte.

Erste Versuche die unerwünschten intestinalen Motilitätsstörungen nach ausgedehnten abdominalen Eingriffen mit dem unselektiven nicht zentral wirksamen Opioidrezeptor Antagonisten ADL 8-2698 im Patienten positiv zu beeinflussen verliefen erfolgreich. Insgesamt wurden 79 Patienten für die Studie randomisiert. Die Auswertung ergab eine signifikant, um mehr als 20h verkürzte Krankenhausverweildauer der nicht Placebo Gruppe (Taguchi et al., 2001). Weiter ist für β -Endorphin eine inhibitorische Wirkung auf die Sekretion von Gastrin beschrieben (Lenz et al., 1986).

Gerade in der Intensivmedizin spielt die motilitäthemmende Wirkung der Opiate und Opioiden eine große Rolle. Oft ist hier eine adäquate Schmerztherapie nur in Kombination mit Opiaten möglich. Durch Einsatz eines selektiven κ -Opioidrezeptor Antagonisten könnte Motilitätsstörungen, bei erhaltener Schmerztherapie über den μ -Rezeptor, entgegengewirkt werden (Riviere et al., 1993).

8.7 Der Einfluss auf den regionalen Blutfluss mit Schwerpunkt auf den Gastrointestinaltrakt

Bereits 1985 konnte ein möglicher Einfluss der endogenen Opioiden auf die Regulation der intestinalen Perfusion gezeigt werden. Hierzu wurde der intestinale Blutfluss beim Hund durch Applikation von Cholezystokinin gesteigert. Eine weitere Steigerung konnte durch Applikation des Opioidpeptides D-Met2-NleS5-enkephalinamid erreicht werden, durch Naloxon wurde der Effekt partiell aufgehoben (Rozsa et al., 1985). In einem septischen Versuchsmodell konnte mit radioaktiv markierten Mikrosphären in vivo eine Verbesserung der Perfusion von Magen, Pankreas, Dünndarm und Coekum, nach Applikation von Naloxon-methylbromid beschrieben werden. Naloxon-methylbromid passiert nicht die Blut-Hirn Schranke.

Der perfusionssteigernde Effekt nach Naloxon Applikation, welches die Blut-Hirn Schranke passieren kann, war lediglich auf Pankreas und Magen beschränkt.

Im septischen Modell ist die Wirkung endogener Opioide laut Studie eher als Mediator vasoaktiver Substanzen aufzufassen. Es scheinen sowohl zentralnervöse als auch periphere Signalkaskaden für die Regulation der Perfusion verantwortlich (Sharma et al., 2000).

Weiter ist der direkte Effekt der einzelnen Opioidpeptide auf die Perfusion zu diskutieren. So ist für Enkephaline eine vasodilatatorische Wirkung auf intestinale Arteriolen beschrieben (Navaratnam et al., 1992). Endorphine wiederum führen bei hohem Plasmaspiegel zu einer Vasokonstriktion (Doty et al., 1988). Von Navaratnam wird den Endorphinen aber eine sowohl vasodilatatorische als auch vasokonstriktive Funktion zugeschrieben (Navaratnam et al., 1992). Für Dynorphin A wurde im Meerschwein in vitro eine vasodilatative Wirkung auf Arteriolen des Dünndarm beschrieben (Kotecha et al., 1995). Einen Hinweis darauf, dass die intestinale Perfusion durch Opioid Antagonismus gesteigert werden könnte, zeigt eine Studie bei welcher der unselektive Antagonist Naloxon als Prämedikation vor Koloskopie zur besseren Darstellung vaskulärer Ektasien eingesetzt wurde (Brandt et al., 1999).

Zur weiteren Differenzierung der bisherigen, sehr unvollständigen, Kenntnisse über die Regulation der intestinalen Perfusion und zur weiteren Differenzierung der Wirkung endogener Opioide und exogener Opiatderivate auf den regionalen Blutfluss des Splanchnikusareals, und des Intestinums im speziellen, müssen folglich Studien mit selektiven Opioidrezeptor Antagonisten durchgeführt werden.

8.8 Diskussion der Ergebnisse

Zusammenfassend konnten wir folgendes feststellen:

- Nach Blockade des κ -Opioidrezeptors mit dem selektiven Antagonisten nor-BNI konnte eine Steigerung des regionalen Blutflusses im Splanchnikusareal, (Magen, Duodenum, Jejunum, distales Ileum, Kolon und Nebenniere) verzeichnet werden.
- Gleichzeitig wurde das HMV durch die Gabe von nor-BNI gesteigert. Die Herzfrequenz und der linksatriale Druck waren dabei nicht erhöht.

Das bedeutet, dass die κ -Opioidrezeptorblockade durch nor-BNI zu einer Steigerung der Inotropie geführt hat.

- Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der regionale Blutfluss der Skelettmuskulatur unter dem Einfluss von nor-BNI reduziert war. Dies ist am ehesten durch ein Umverteilungsphänomen, zugunsten der Splanchnikusperfusion zu erklären.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Gabe von nor-BNI zu einer Steigerung des HMV führt, und gleichzeitig durch vasoaktive Effekte die gastrointestinale Perfusion verbessert. Dadurch, dass ein intrinsischer Effekt, vermittelt durch nor-BNI, weitestgehend ausgeschlossen werden kann, sind die beschriebenen Effekte am ehesten durch die Rezeptorblockade vermittelt. Anders ausgedrückt, sind unter Ruhebedingungen offensichtlich κ -agonistische endogene Opioidpeptide, bzw. andere auch an diesem Rezeptor wirkende Substanzen, vorhanden. Diese bewirken oder regulieren die myokardiale Funktion und den Gefäßtonus des Gastrointestinaltraktes. Diese regulativen Mechanismen sind möglicherweise auch im Menschen vorhanden. Bisher werden diese therapeutisch aber nicht genutzt, vermutlich weil nur sehr rudimentäre Vorstellungen über die Wirkungsweise beim Menschen vorhanden sind. Die offensichtlich durch κ -Opioidrezeptoragonisten vermittelte negative Inotropie, ist möglicherweise auch beim Menschen die Ursache, oder trägt auch zur hämodynamischen Instabilität bei Patienten bei. In der Literatur konnte mehrfach gezeigt werden, dass bei Intensivpatienten v.a. mit Sepsis, die endogenen Opioidpeptid Konzentrationen im Plasma ansteigen. Es ist weiterhin bekannt, dass eine starke Interaktion zwischen dem endogenen Opioidpeptidsystem und dem vegetativen Nervensystem besteht. Man geht davon aus, dass interaktive neurohumorale Regelkreise dazu führen, dass bei Aktivierung beispielsweise des Sympathikus die Ausschüttung von endogenen Opioidpeptiden getriggert wird. Möglicherweise werden die primär aktivierenden Momente des Sympathikus, wie z.B. die positive Inotropie oder positive Chronotropie, durch die negativ inotropen Dynorphine (= κ -Opioidrezeptor Agonisten) retadiert antagonisiert. Denkbar wäre eine Art Gegenregulationsmechanismus, der eine überschießende Aktivierung des Sympathikus hemmt. Dieser Mechanismus ist möglicherweise unter physiologischen Bedingungen nützlich und sinnvoll. Bei Intensivpatienten mit endogen und exogen erhöhten Katecholaminspiegeln, sind aber konsekutiv erhöhte Dynorphinspiegel mit deren negativ inotropen Effekten kontraproduktiv,

da durch selbige die hämodynamische Instabilität weiter forciert wird. Die Folge ist eine weitere Steigerung der exogenen Katecholamin Dosierungen.

Hierdurch werden nicht nur die Nebenwirkungen gesteigert, sondern auch noch eine zusätzliche Ausschüttung von weiteren Dynorphinen provoziert. Diese wirken wiederum negativ inotrop, wodurch der Teufelskreis geschlossen wird. Um diesen zu durchbrechen wäre daher ein möglicher Ansatz, frühzeitig die Wirkung der κ -Opioidrezeptor Agonisten (=Dynorphine) durch eine selektive Blockade zu inhibieren. Damit hätte man nicht nur eine neue Möglichkeit die hämodynamische Instabilität beispielsweise bei septischen Patienten zu behandeln, sondern auch gleichzeitig die gastrointestinale Minderperfusion bei diesen Patienten entscheidend zu verbessern. Es ist somit davon auszugehen, dass die Steigerung des regionalen Blutflusses am Intestinum durch eine Kombinationswirkung aus κ -Opioidrezeptorantagonismus am Herzen, mit Inotropiesteigerung, als auch durch κ -Antagonismus am Intestinum mit Vasodilatation zu begründen ist. So wird es vielleicht in der Zukunft möglich sein, mit der Entwicklung weiterer hochselektiver Opioidrezeptoragonisten und -antagonisten, sowie mit weiterer Forschung am endogenen Opioidsystem, wesentlich differenziertere Therapien durchzuführen.

8.9 Zusammenfassung

Unsere Untersuchungen konnten eine Zunahme des RBF im Splanchnikusareal, nach selektiver Blockade des κ -Opioidrezeptors mit dem selektiven κ -Opioidrezeptor Antagonisten nor-BNI, im chronisch instrumentierten Hund unter Ruhebedingungen zeigen.

Dieser Effekt wird vermutlich zum einen Teil über ein vergrößertes HMV durch einen positiv inotropen Effekt der selektiven κ -Rezeptor Blockade verursacht. Zum anderen Teil kommt es durch κ -Rezeptor Blockade zu einer direkten Vasodilatation im Splanchnikusareal.

9. Literaturverzeichnis

Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM: Endogenous opioidpeptids: biology and function. *Ann Rev Neurosci* 1984; 7:223-55

Allescher HD, Ahmad S, Daniel EE, Dent J, Kostolanska F, Fox JE: Inhibitory opioidpeptid receptors in canine pylorus. *Am J Physiol* 1988; 255:G352-60

Aneman A, Medbak S, Watson D, Haglind E: Changes in circulating plasma met-enkephalin concentrations in feline intestinal ischemia reperfusion. *Res Exp Med (Berl)* 1994; 194:129-38

Brandt LJ, Spinnell MK: Ability of naloxone to enhance the colonoscopic appearance of normal colon vasculature and colon vascular ectasias. *Gastrointest Endosc* 1999; 49:79-83

Brent RL: Utilization of animal studies to determine the effects and human risks of environmental toxicants (drugs, chemicals, and physical agents). *Pediatrics* 2004; 113:984-95

Brown DR, Timmermans JP: Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 1:50-4

Bueno L, Fioramonti J: Enkephalins, other endogenous opioids and colonic motility in dog and man. *Gastroenterol Clin Biol* 1987; 11:69-76B

Burks TF, Galligan JJ, Hirning LD, Porreca F: Brain, spinal cord and peripheral sites of action of enkephalins and other endogenous opioids on gastrointestinal motility. *Gastroenterol Clin Biol* 1987; 11:44-51B

Caffrey JL, Gaugl JF, Jones CE: Local endogenous opiate activity in dog myocardium: receptor blockade with naloxone. *Am J Physiol* 1985; 248:H382-8

Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Ju L: Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1993; 44:8-12

Daniel EE, Gonda J, Domoto J, Oki M: Peptide neurons in the canine small intestine. *J Comp Neurol* 1985; 237:227-38

Davies A, Green C, Hutton J, Chinn C: Severe sepsis: a european estimate of the burden of disease in ICU. *Intensive Care Med* 2001; 27:581

Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M: International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 1996; 48:567-92

Domenech RJ, Hoffman JJ, Noble MI, Saunders KB, Henson JR, Subijanto S: Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs. *Circ Res* 1969; 25:581-96

Doty S, Traber L, Herndon D, Kimura R, Lubbesmeyer H, Davenport S, Traber D: Beta-Endorphin, a vasoconstrictor during septic shock. *J Trauma* 1988; 28:131-9

Edin R, Lundberg J, Terenius L, Dahlsröm A, Hökfelt T, Kewenter J, Ahlman H: Evidence for vagal enkephalinergic control of the feline pylorus and stomach. *Gastroenterology* 1980; 78:492-7

Endoh T, Matsuura H, Tanaka C, Nagase H: Nor-binaltorphimine: a potent and selective kappa-opioid receptor antagonist with long-lasting activity in vivo. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1992; 316:30-42

Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH: Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258:1952-5

Ferry GL, Adrian TE, Ghatei MA, Soimero L, Rebecchi L, Bilotti G, Polak JM, Bloom SR: Intramural distribution of regulatory peptides in human stomach and duodenum. *Hepato gastroenterology* 1987; 34:81-5

Festing MF, Altman DG: Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J* 2002; 43:244-58

Fickel J, Bagnol D, Watson SJ, Akil H: Opioid receptor expression in the rat gastrointestinal tract: a qualitative study with comparison to the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 46:1-8

Fiocchi R, Bianchi G, Petrillo P, Tavani A, Manara L: Morphine inhibits gastrointestinal transit in the rat primarily by impairing propulsive activity of the small intestine. *Life Sci* 1982; 31:2221-3

Frey L, Kesel K: Significance of perfusion of the gastrointestinal tract in shock. *Anaesthesist* 2000; 49:446-50

Gautret B, Schmitt H: Central and peripheral sites for cardiovascular actions of dynorphin-(1-13) in rats. *Eur J Pharmacol* 1985; 111:263-6

Glenny RW, Bernad S, Brinkley M: Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 1993 May; 74(5):2585-97

Glenny RW, Bernard SL, Lamm WJ: Hemodynamic effects of 15-microm-diameter microspheres in the rat pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 2000; 89:499-504

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapillar M, Hood L: Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 6666-70

Grosse Hartlage MA, Berendes E, Van Aken H, Fobker M, Theisen M, Weber TP: Xenon improves recovery from myocardial stunning in chronically instrumented dogs. *Anesth Analg* 2004; 99:655-64

Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR: Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res* 1995; 29:74-9

Hartung T, Wedel A: Development of a cell culture model for septic shock multiorgan failure. *ALTEX* 1993; 10:16-24

Hartung T, Wendel A: Is replacement of animal experimentation in pharmacology a goal or a social constraint, utopia or reality? *ALTEX* 1998; 15:9-10

Hansen MB, Dresner LS, Wait RB: Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. *Physiol Res* 1998; 47:307-27

Hansen MB. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* 2003; 92:249-57

Harringer W, Fernandez-del Castillo C, Rattner DW, Guerrero JL, Warshaw AL, Vlahakes GJ: Evaluation and validation of microsphere technique for determination of pancreatic blood flow. *Am J Physiol* 1993; 265:G587-94

Hasenfuss G: Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1998; 39:60-76

Hawan BN, Cesselin F, Rhaghubir R, Reisine T, Bradley PB, Porthogese PS, Hammon M: International union of pharmacology: XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 48: 567-92

Heymann MA, Payne BD, Hoffman JI, Rudolph AM: Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* 1977; 20:55-79

Holaday JW: Cardiovascular effects of endogenous opiate system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:541-94

Hughes J, Smith T, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; 258: 577-80

Ince C, Sinaasappel M: Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 1999; 27:1369-77

Jessen KR, Saffrey MJ, Van Noorden S, Bloom SR, Burnstock G: Immunohistochemical studies of the enteric nervous system in tissue culture and in situ: localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance-P and enkephalin immunoreactive nerves in the guinea-pig gut. *Neuroscience* 1980; 5:1717-35

Johnson PD, Besselsen DG: Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR J* 2002; 43:202-6

Kannan MS, Seip AE: Neurogenic dilatation and constriction of rat superior mesenteric artery in vitro: mechanisms and mediators. *Can J Physiol Pharmacol* 1986 Jun; 64:729-36

Kasper E, Ventura C, Ziman BD, Lakatta EG, Weisman H, Capogrossi MC: Effect of U-50,488H on the contractile response of cardiomyopathic hamster ventricular myocytes. *Life Sci* 1992; 50:2029-35

Kobayashi N, Kobayashi K, Kouno K, Horinaka S, Yagi S: Effects of intraatrial injection of coloured microspheres on systemic hemodynamics and regional blood flow in rats. *Am J Physiol* 1994; 266:H1910-17

Landow L, Anderson LW: Splanchnic ischemia and its role in multiple organ failure. *Acta Anesthesiol Scand* 1994; 38:626-39

Lechner RB: Naloxone potentiates the inotropic effects of isoproterenol in vitro by a nonopioid receptor mechanism. *Circ Shock* 1992; 38:157-64

Lenz HJ, Klapdor R, Hester SE, Webb VJ, Galyen RF, Rivier JE, Brown MR: Inhibition of gastric acid secretion by brain peptides in the dog. Role of the autonomic nervous system and gastrin. *Gastroenterology* 1986; 91:905-12

Li CH, Lemaire S, Yamashiro D, Doneen BA: The synthesis and opiate activity of beta-endorphin. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71:19-25

Luna SP, Taylor PM: Cardiorespiratory and endocrine effects of endogenous opioidpeptid antagonism by naloxone in ponies anaesthetised with halothane. *Res Vet Sci* 2001; 70:95-100

Matheson PJ, Wilson MA, Garrison RN: Regulation of intestinal blood flow. *J Surg Res* 2000 Sep; 93(1):182-96

Maycock PF, Frayn KN: Use of alumina columns to prepare plasma samples for liquid-chromatographic determination of catecholamines. *Clin Chem* 1987; 33:286-7

Maxwell LC, Shepherd AP, Riedel GL, Morris MD: Effect of microsphere size on apparent intramural distribution of intestinal blood flow. *Am J Physiol* 1981; 241:H408-14

McCubbin JA: Stress and endogenous opioidpeptids: Behavioural and circulatory interactions. *Biol Psychol* 1993; 35:91-122

McDevitt DG, Nies AS: Simultaneous measurement of cardiac output and its distribution with microspheres in the rat. *Cardiovasc Res* 1976; 10:494-8

Merg F, Filliol D, Usynin I, Bazov I, Bark N, Hurd YL, Yakovleva T, Kieffer BL, Bakalkin G: Big dynorphin as a putative endogenous ligant for the kappa-opioid receptor. *J Neurochem* 2006 Apr; 97:292-301

Muller AP: Diagnosis and conservative therapy of anal fecal incontinence. *Ther Umsch* 2003; 60:263-7

Naredi P, Mattsson J, Hafstrom L: Aggregation of microspheres in blood flow measurements. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991; 10:169-80

Navaratnam N, Herndon DN, Woodson LC, Linares HA, Morris S, Traber DL: Endorphin mediation of mesenteric blood flow after endotoxemia in sheep. *Crit Care Med* 1992; 20:402-8

Nieber K, Oehme P: Stress and the endogenous opioid system. I. Physiology and pharmacology of opioid peptides. *Z Gesamte Inn Med* 1985; 40:1-7

Odendaal JS, Meintjes RA: Neurophysiological correlates of affiliative behaviour between humans and dogs. *Vet J* 2003; 165:296-301

Parker DR, Braatvedt GD, Halliwell M, Corall RJ: Physiological control of splanchnic blood flow by adrenaline: studies during acute hypoglycaemia in men. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96:623-9

Portas Gonzales M, Garutti Martinez I, Fernandez-Querro Bonilla L: Gastrointestinal tonometry: a new tool for the anaesthesiologist. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 2003; 50:401-8

Porthogese PS, Lipkowski AW, Takemori AE: Binaltorphimine and nor-binaltorphimine, potent and selective κ -opioid receptor antagonists. *Life Sciences*. 1987; 40:1287-92

Priebe HJ: The acute open chest model. *Br J Anaesth* 1988; 60:38-41S

Prinzen FW, Glenn RW: Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1467-75

Rattenbacher M, Reubi JC: Localization and characterization of neuropeptide receptors in human colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364:291-304

Reinscheid RK, Nothaker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civellio C. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein coupled receptor. *Science* 1995; 270:792-4

Rijberk A, Kooistra HS, Mol JA: Endocrine disease in dogs and cats: similarities and differences with endocrine disease in humans. *Growth Horm IGF Res* 2003;13: 158-164

Riviere PJ, Pascaud X, Chevalier E, Le Gallou B, Junien JL: Fedotozine reverses ileus induced by surgery or peritonitis: action at peripheral kappa-opioidpeptid receptors. *Gastroenterology* 1993; 104:724-31

Rozsa Z, Varro V: Mechanism of action of cholezystokinin on intestinal blood flow interactions with opioidpeptid peptides and vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides* 1985; 6:71-81

Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibbert PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR: Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group 1997. *Jama* 1997; 278:234-40

Sagy M, Shavit G, Oron Y, Vidne BA, Gitter S, Sarne Y: Nonopiate effect of naloxone on cardiac muscle contractility. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9:682-5

Sakamoto S, Stone CK, Woolf PD, Liang CS: Opiate receptor antagonism in right-sided congestive heart failure. Naloxone exerts salutary hemodynamic effects through its action on the central nervous system. *Circ Res* 1989; 65:103-14

Schwartzkopff B, Hennersdorf M: Influence of cardiac circulation and medication on the perfusion of the intestine. *Zentralbl Chr* 2005; 130:218-22

Sharma AC, Sam AD, Alden KJ, Moore SL, Law WR, Ferguson JL: Central versus peripheral mediation of naloxon's perfusion effects in endotoxic rats. *Shock* 2000; 14:441-6

Smet F, D'Aubioul J, van Gerven W, Xhonneux R, Renemann RS: A chronically implantable catheter-tip micromanometer (JSI 0400) that can be calibrated after implantation. *Cardiovasc Res* 1979;13:601-5

Smith AP, Lee NM: Opioidpeptid receptor interactions: local and nonlocal, symmetric and asymmetric, physical and functional. *Life sciences* 2003; 73:1873-93

Sternini C: Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. III. Mu-opioidpeptid receptors in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G8-15

Sullivan SN, Lamki L, Corcoran P: Inhibition of gastric emptying by enkephalin analogue. *Lancet* 1981; 2: 86-7

Taguchi A, Sharma N, Saleem RM, Sessler DI, Carpenter RL, Seyedsadr M, Kurz A: Selective postoperative inhibition of gastrointestinal opioidpeptid receptors. *N Engl J Med* 2001; 345:935-40

Tai KK, Jin WQ, Chan TK, Wong TM: Characterization of [³H]U69593 binding in sites in the rat heart by receptor binding assays. *J Moll Cell Cardiol* 1991; 23:1297-1302

Triana JF, Li XY, Jamaluddin U, Thornby JI, Bolli R: Postischemic myocardial "Stunning". Identification of major differences between the open-chest and the conscious dog and evaluation of the oxygen radical hypothesis in the conscious dog. *Circ Res* 1991; 69:731-47

Vatner SF, Franklin D, Braunwald E: Effects of anaesthesia and sleep on circulatory response to carotid sinus nerve stimulation. *Am J Physiol* 1971; 220:1249-55

Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC: Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ Res* 1992; 70:66-81

Wallus KM, Pawlik W, Konturek SJ, Schally AV: Effect of met-enkephalin and morphine on gastric secretion and blood flow. *Acta Physiol Pol* 1981; 32:383-92

Watson SJ, Akil H, Ghazarossian VE, Goldstein A: Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system: preliminary studies. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1981; 78:1260-3

Weber TP, Meissner A, Stypmann J, Grosse Hartlage MA, Van Aken H, Rolf N: Naloxone improves splanchnic perfusion in conscious dogs through effects on the central nervous system. *Anesthesiology* 2002; 96:438-41

Wong TM, Lee AY, Tai KK: Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart – an attempt to identify cardiac receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J Moll Cell Cardiol* 1990; 22:1167-75

Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI: Cloning and functional comparison of kappa and delta opioidpeptid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6736-40

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ: A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 1997; 386:499-502

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. Van Aken, Direktor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. T. P. Weber, sowie Frau Dr. med. M. A. Grosse Hartlage für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit. Beide waren in jeder Phase immer zuverlässige Ansprechpartner und haben mich in jeder Phase der Arbeit wertvoll unterstützt. Sie haben damit maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Auch bedanken möchte ich mich bei Christina Mückenhaupt und David Lange für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit während der Tierversuchsphase.



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Frau
Maika Anja Große Hartlage
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und
operative Intensivmedizin
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

Dienstgebäude:

Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2104
Telefax: 2115
Raum: 423
Auskunft erteilt:
Kerstin Stichling
E-Mail:
kerstin.stichling@bezreg-muenster.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.0 (G 86/2000)



Mai 2002

Tierschutz

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

„Die medikamentöse Beeinflussung der Perfusion und Funktion von normalem, ischämischem und postischämischem Myokard bei chronisch instrumentierten Hunden“

Ihr Antrag vom 30.04.2002

Mein Genehmigungsbescheid vom 08.01.2001 – Az.: 50.0835.1.0 (G 86/2000) –

Sehr geehrter Frau Große Hartlage,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum 31.07.2003.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de • zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf: Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis Haltestelle Windthorststraße (Haus K), Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz (Häuser A, B, C, H), Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W), Linie 15 bis Haltestelle Inselbogen (Haus F), Linie 1 • 9 bis Haltestelle Königsweg (Haus D).

Die Häuser S und T sind fußläufig 5 Min. vom Hbf in Richtung Innenstadt erreichbar.