Akuteffekt von Anthrachinonen (Sennosiden, Danthron), Bisacodyl und Na-Picosulphat auf den Gehalt von Somatostatin, VIP und Substanz P im Rattenkolon

Zoi Malamoussi

Aus der Medizinischen Klinik - Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Akuteffekt von Anthrachinonen (Sennosiden, Danthron), Bisacodyl und Na-Picosulphat auf den Gehalt von Somatostatin, VIP und Substanz P im Rattenkolon

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Zoi Malamoussi
aus
Ludwigshafen am Rhein

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Klauser

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Claus Schäfer
Prof. Dr. med. Hermann Füeßl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. K. Tzavella

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2008

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. A. Klauser für die Bereitstellung des Themas, die wohlwollende Betreuung und die konstruktive Kritik bei der Zusammenstellung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. K. Tzavella für die intensive und exzellente Betreuung während meiner Arbeit im Labor, sowie für die großartige Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse und bei der Zusammenstellung der Arbeit.

Herrn Dr. R.L. Riepl für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Radioimmunoassays.

Meinem Ehemann Dr. K. Vliagkoftis für seine außerordentliche Geduld und Liebe.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

1. Historischer Überblick über die Laxantien 1
2. Obstipation und Laxantieneinnahme 1
2.1. Einteilung der Laxantien 3
3. Aktuelle Bedeutung der Laxantien 5
4. Unerwünschte Wirkungen der Laxantien 6
5. Zielsetzung 8

II. Versuchstiere, Material und Methoden 10

1. Versuchstiere 10
2. Material, Geräte, Substanzen, Lösungen 10
2.1. Material 10
2.2. Geräte 10
2.3. Substanzen 11
2.4. Lösungen 12
3. Methoden 13
3.1. Behandlung der Versuchstiere 13
3.2. Präparation der Darmsegmente 14
3.3. Peptidextraktion 16
3.4. Radioimmunologische Bestimmung der Neuropeptide 16
3.4.1. Prinzip eines Radioimmunoassays 16
3.4.2. Assay-Ansätze für die Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P 17
3.4.3. Berechnung der Neuropeptidkonzentrationen 20
3.5. Statistische Auswertung 23

III. Ergebnisse 24

1. Verteilung der untersuchten Neuropeptide bei den Kontrolltieren 24
2. Akuteffekt der Laxantienbehandlung auf die Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P 34
2.1. 2 Stunden nach der Einzeldosisbehandlung mit Laxantien 34

2.2. 6 Stunden nach der Einzeldosisbehandlung mit Laxantien 38
2.3. 18 Stunden nach der Einzeldosisbehandlung mit Laxantien..... 42

IV. Diskussion 46
1. Verteilung der untersuchten Neuropeptide VIP, Somatostatin
und Substanz P bei den Kontrolltieren 46
2. Akuteffekt der Laxantienbehandlung 47

V. Zusammenfassung 53

VI. Literaturverzeichnis 55

VII. Lebenslauf 64

I. Einleitung

1. Historischer Überblick über die Laxantien

Abführmaßnahmen waren bereits in der Antike bekannt. 2500 v. Chr. wurde in Mesopotamien und in Ägypten das aus Rizinussamen gewonnene Öl für diese Zwecke eingesetzt. Die Assyrer kannten um 1500 v. Chr. neben der Verwendung von ballaststoffreicher Nahrung, wie beispielsweise Kleie, auch salinische Abführmittel (Gerabeck et al., 2004).
Im neunten Jahrhundert liegen über die Araber Überlieferungen vor, wonach die Anwendung von Sennesschotten und die schwächer wirksamen Blätter der Sennesfrüchte der Befreiung des Körpers von Fieber, Epilepsie und Melancholie diente (Lemli, 1988).
Im Laufe der Jahrhunderte kamen neben allgemeinen Methoden zur Darmentleerung wie Klistieren, auch Abführmittel hinzu, wie zum Beispiel im 17. Jahrhundert das Natriumsulfat (Sonneberg u. Sonneberg 1989).
Man kann erkennen, dass die Obstipation nicht, wie oft angenommen, ein modernes „Zivilisationsproblem" darstellt, sondern dass sie die Menschheit schon seit langem begleitet.

2. Obstipation und Laxantieneinnahme

Die Obstipation stellt heutzutage eins der häufigsten gastroenterologischen Probleme der Bevölkerung dar und beinhaltet eine Reihe von funktionellen Beschwerden, die mit erschwerten, seltenen oder inkompletten Stuhlentleerungen einhergehen. Ca. 20% der Erwachsenen leiden unter hartem oder seltenem Stuhlgang, wobei die Prävalenz bei den Frauen 2- bis 3mal höher ist als bei den Männern. Sie nimmt auch mit steigendem Alter zu (Drossmann et al., 1993; Everhardt JE et al., 1989).

Die Diagnose der Obstipation gilt nach den ROM II-Kriterien als gesichert, wenn innerhalb von 12 Monaten in drei davon mindestens zwei der folgenden Kriterien (bei mindestens 25% der Defäkationen) zutreffen: a) Pressen zur Stuhlentleerung, b)

harter Stuhlgang, c) Gefühl der unvollständigen Entleerung, d) Gefühl der anorektalen Blockierung, e) manuelle Unterstützung der Stuhlentleerungen, f) weniger als drei Stuhlentleerungen pro Woche (Thompson et al., 1999).
Die Obstipation wird im Wesentlichen von einer Störung der Bewegung des Stuhlganges durch den Darm bestimmt. Gründe dafür können idiopathischer Natur sein oder durch eine Vielzahl anderer Faktoren verursacht werden wie z.B durch eine Störung der motorischen Funktion des Darms oder durch einen unerwünschten Effekt verschiedener Arzneimittel. Die Motorik des Gastrointestinaltraktes wird durch das enterische, sympathische und parasympathische Nervensystem koordiniert, so dass Erkrankungen des zentralen oder peripheren Nervensystems mit einer Obstipation einhergehen können. Andere Ursachen einer Obstipation können metabolische und endokrine Erkrankungen sein, wie z.B. der Diabetes mellitus und Obstruktionen im Gastrointestinaltrakt.

Ein wesentlicher Grund für den Laxantiengebrauch bzw. -Missbrauch ist die falsche Vorstellung über die Obstipation und deren Bedeutung. Viele glauben, dass nur die tägliche Stuhlentleerung normal sein kann, und dass Abweichungen davon zu einer Akkumulation von toxischen Substanzen führen können, die mit einer Reihe von verschiedenen körperlichen Symptomen assoziiert sind. Häufig spielt eine Gewichtsreduktion durch die Einnahme von Laxantien, vor allem bei jüngeren Frauen, eine große Rolle.
Der Umgang mit der Obstipation wird weitgehend von der Selbstdiagnose und der Selbstmedikation bestimmt. Letzteres wird auch durch die freie Verfügbarkeit der Laxantien erleichtert. Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes über das Konsumverhalten von Medikamenten in Deutschland im Jahr 2003, liegt der Anteil an ärztlich verordneten Laxantien bei 0,21% und der Anteil an selbstverordneter Laxantien bei 0,8 % (Knopf und Melchert, 2003). Diese Angaben zeigen einen geringen Anteil an Verbrauch von Laxantien, was auf einen bewussten Umgang mit diesen Medikamenten schließen lässt. Die bessere Aufklärung und Beratung durch den Arzt oder Apotheker trägt dazu bei.

Von den eingenommenen Präparaten liegen Anthrachinone (Aloe, Senna) und diphenolische Laxantien (Bisacodyl, Natriumpicosulphat) mit 84% an erster Stelle, gefolgt von osmotischen Laxantien mit ungefähr 10% (Holtermüller, 2002).

2.1. Einteilung der Laxantien

Laxantien sind Substanzen, die die Defäkation fördern und erleichtern. Sie werden auch Purgativa oder Kathartika genannt und vorwiegend nach ihrem Wirkmechanismus in fünf Gruppen (I-V) eingeteilt (Tedesco u. DiPiro, 1985; Müller-Lissner, 1992) (Tabelle 1).
Ferner unterscheidet man ihrer Wirkung nach zwei grundlegende Prinzipien: a) Zunahme des Stuhlvolumens durch Beeinflussung der Flüssigkeitsresorption oder der aktiven bzw. passiven Sekretion (Gruppen I, II, III und V), und/oder b) primäre Steigerung der Kolonmotilität durch direkten Angriff an den Nervenzellrezeptoren oder an der Muskulatur (Gruppen II und IV) (Hardcastle et al., 1970; Mitznegg et al., 1975).

Gruppe I: Ballaststoffe sind unverdauliche und nicht resorbierbare Stoffe und führen durch eine vermehrte Wasseraufnahme zu einer Vergrößerung des Stuhlvolumens, wodurch die Darmwand gedehnt, und somit ein reflektorischer Defäkationsprozess ausgelöst wird.
Ferner können Ballaststoffe, im Falle einer bakteriellen Spaltung im Kolon, eine Erhöhung der Bakterienmasse und somit eine Zunahme des Darmvolumens herbeiführen.
Salinische Laxantien (z.B. Magnesium- und Natriumsulphat) entfalten ihre laxierende Wirkung über eine osmotische Wasserbindung im Darmlumen. Die Zucker und Zuckeralkohole (z.B Lactulose) werden im Dünndarm kaum resorbiert und wirken somit im Dickdarm ebenfalls osmotisch; zusätzlich werden sie durch Bakterien der Darmflora gespalten, wodurch sich die Bakterienmasse und das Stuhlvolumen erhöhen (Bass u. Dennis, 1981).

Gruppe II: Zu der Gruppe der Laxantien, die antiabsorptiv, sekretagog und prokinetisch wirken gehören die Athrachinone, die diphenolischen Laxantien und die Fettsäuren. Anthrachinone und diphenolische Laxantien zählen zu den am häufigsten eingenommenen Präparaten. Ihre antiabsorptive und sekretagoge Wirkung entfalten sie durch Hemmung der Wasser- und Elektrolytabsorption im Darmlumen über unterschiedliche Wirkmechanismen und führen somit zu einem vermehrten Einstrom vom Wasser im Darmlumen (Binder u. Donowitz, 1975). Eine Stimulation der Chloridsekretion (Clauss et al., 1988; Goerg et al., 1988) und die Vermittlung der Effekte über Prostaglandine (Yagi, 1988, 1990) und über Calzium-Kanäle (Yamauchi et al., 1993) wurden diskutiert. Die prokinetische Wirkung erfolgt durch direkte Zunahme der kontraktilen Aktivität des Darmes.

Es gibt Unterschiede zwischen den Laxantien dieser Gruppe hinsichtlich der Pharmakokinetik.
Die Anthrachinone liegen hauptsächlich in natürlicher Form als Glykoside vor. Im Kolon werden die wirksamen Aglykone durch bakterielle Spaltung der Glykoside freigesetzt (Lemli, 1988; Hattori et al., 1988).
Die in Präparaten enthaltenen Anthrachinone sind vorwiegend die Sennoside A und B, die ihre Wirkung über den aktiven Metaboliten Rhein entfalten. Im Gegensatz zu den Sennosiden, die nur im Dickdarm wirken, wird das synthetisch hergestellte Danthron (1,8- Dihydroxyanthrachinon) teilweise im Dünndarm resorbiert. Deshalb hat es eine geringere laxierende Wirkung als die Sennoside (Lang, 1988; Breimer u. Bars, 1976). Danthron wurde jedoch wegen nachgewiesener Toxizität und Kanzerogenität bei Mäusen und Ratten (Mori et al. 1986,1990; Siegers et al. 1992) im Jahr 1987 aus dem Handel genommen.
Zu den diphenolischen Laxantien werden das Bisacodyl und das Natriumpicosulphat gerechnet. Bisacodyl unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf. Es wird im Dünndarm desacetyliert, in der Leber glukuronidiert und mit der Galle in den Dünndarm sezerniert; von dort aus gelangt es in den Dickdarm. Dort ist Bisacodyl nicht resorbierbar und wird durch bakterielle Spaltung in die wirksame Form dekonjugiert (Sund et al., 1981; Jauch et al., 1975). Dies ist der Grund, weshalb Bisacodyl seine laxierende Wirkung später entfaltet, 8-10 Stunden nach oraler Einnahme, im Gegensatz zu den Anthrachinonen und Natriumpicosulphat, die bereits nach 5-8 Stunden wirken. Es wurden aber galenische Formen entwickelt (magensaftresistente, pH-gesteuerte Dragees und Suppositorium), um die Resorption erst im unteren Dünndarm bzw. im Dickdarm zu ermöglichen (Roth, 1988).
Natriumpicosulphat ist eine sulphatierte Form des Bisacodyls und gelangt nach oraler Aufnahme unverändert in den Dickdarm; dort wird es in die wirksame Form bakteriell gespalten und somit umgeht es den enterohepatischen Kreislauf (Jauch et al., 1977).
Als Hauptvertreter der Fettsäuren gilt die Rhizinolsäure, die bei der Hydrolyse des Rhizinusöls im Darm freigesetzt wird. Die Hydroxyfettsäuren stimulieren sowohl die Sekretion als auch die Motilität. Da ihre Wirkung sehr drastisch ist und im Dünndarm schon beginnt, werden die Fettsäuren heute nicht mehr empfohlen (Karaus, 1987).

Gruppe III: Dihydroxygallensäuren erhöhen die Durchlässigkeit der epithelialen Schlussleisten und steigern den parazellulären Wassereinstrom in das Kolon. Es existieren keine klinischen Studien zum Einsatz als Laxantien, somit finden sie kaum Anwendung im klinischen Alltag.

Gruppe IV: Cisaprid, eine reine prokinetische Substanz, entfaltet seine Wirkung über

den Agonismus an 5-HT3 und 5-HT4 Rezeptoren und steigert die Motilität im Kolon (Talley et al., 1990). Es unterliegt dem enterohepatischem Kreislauf, sodass nach dem First-Pass-Effekt nur fünfzig Prozent der Substanz zur Verfügung stehen. Allerdings traten in wenigen Fällen lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen auf (Mutschler et al., 2001). Deswegen veranlasste das Bundesinstitut für Arzneimittel im Jahr 2000 das Ruhen der Zulassung. Heute spielt Cisaprid keine Rolle im klinischen Alltag mehr.

Gruppe V: Hauptvertreter der Gleitmittel ist das Paraffin. Es wirkt ausschließlich durch Erhöhung der Gleitfähigkeit des Stuhls und führt somit zur besseren Absetzbarkeit dessen. Allerdings ist es schlecht untersucht worden und hat kaum klinische Bedeutung.

Tabelle 1: Klassifikation und Wirkmechanismen der Laxantien

Gruppen nach Wirkmechanismus	Laxantien	Substanzen
I. Wasserbindung	Ballaststoffe -pflanzlich -synthetisch	Leinsamen, Weizenklaie Polyethylenglykol Polycarbophil
	Osmotisch -salinische Laxantien -Zucker, Zuckeralkohole	Magnesiumsulphat, Natriumsulphat Mannitol, Sorbitol, Laktilol, Laktose, Laktulose, Glyzerin
II. Antiabsorptiv, sekretagog und prokinetisch	Anthrachinone	Aloe, Senna, Danthron
	Diphenolische Laxantien	Phenolophtalein, Bisacodyl, Natriumpicosulphat
	Fettsäuren	Rhizinolsäure
III. Antiabsorptiv und sekretagog	Gallensäuren	Cholsäure Dechydrocholsäure
IV. Prokinetisch	Cisaprid	Cisaprid
V. Erhöhung der Gleitfähigkeit	Gleitmittel	Docusat-Natrium (Paraffin)

3. Aktuelle Bedeutung der Laxantien

Laxantien gehören zu den am meisten eingenommenen Präparaten. Dies wird noch deutlicher, wenn man den Umsatz von Laxantien betrachtet: Nach Schätzungen war im Jahre 2001 in Deutschland der Umsatz von Laxantien bei 48,4 Millionen Euro; dies entsprach einer Zunahme von 6,2% gegenüber dem Vorjahr. Am häufigsten wurden Zucker bzw. Zuckeralkohole (Lactulose) verschrieben, gefolgt von diphenolischen Laxantien (Bisacodyl, Natriumpicosulphat) und Anthrachinonen (Senna).

Umfragen der Bevölkerung ergaben, dass zehn bis vierzehn Prozent der weiblichen und ungefähr zwei Prozent der männlichen Bevölkerung regelmäßig Abführmittel einnehmen (Klauser et al. 1989).
Gibt man in einer Internet-Suchmaschine das Stichwort „Laxantien" ein, erscheint eine Vielzahl von Beiträgen, über 21.000, was auf ein erhöhtes Interesse der deutschen Bevölkerung schließen lässt. Außerdem ist dies ein Indikator für die Alltagsproblematik der Menschen.

Demgegenüber wird jedoch in den Lehrbüchern neueren Datums den Laxantien ein deutlich geringerer Stellenwert eingeräumt. Dies zeigt die geringe Anzahl der Seiten in den jeweiligen Büchern: Im Standartwerk von Forth et al., 2005 (Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie) werden Laxantien in fünf Seiten abgehandelt; Kuschinsky et al., 2002 (Pharmakologie und Toxikologie) widmen drei Seiten; Lüllmann et al., 2003 (Pharmakologie und Toxikologie) sprechen über Laxantien in dreieinhalb Seiten.
Es ist auffallend, dass gerade Ärzte Vorurteile gegenüber Laxantien entweder aus mangelndem Wissen, oder durch wiedersprüchlige Untersuchungen über Nebenwirkungen dieser Medikamente haben (Leng-Peschlow, 1992).

Die Tatsache, dass kein einziges Abführmittel rezeptpflichtig ist, erleichtert den Patienten die Selbstmedikation, die die Arzt-Patienten-Beziehung erheblich belastet und eine präzise Diagnosestellung erschwert (Klauser et al., 1989).
Bezeichnend ist, dass sich bei Patienten mit chronischer Diarrhoe in 25 Prozent der Fälle eine Laxantieneinnahme als Ursache zeigt. (Read et al., 1980).

4. Unerwünschte Wirkungen der Laxantien

Auch bei einem bestimmungsgemäßen Gebrauch eines Laxans, d.h. die Einnahme in einer Dosis, die zu einer beschwerdefreien Darmentleehrung führt, können unerwünschte Wirkungen auftreten. So wurden nach der Einnahme von Sennosiden und Diphenylmethanen in einer therapeutischen Dosierung Bauchschmerzen und Tenesmen beschrieben. Bei den nicht resorbierbaren Zuckern kann es zu Meteorismus und Flatulenz kommen.

Laxantien, vor allem die osmotischen und die antiabsorptiv-sekretagogen, können zu einer Hypokaliämie führen, indem sie die Kaliumausscheidung im Stuhl (Ewe u. Karbach, 1986; Cummings, 1974) und die Kaliumpermeabilität der Mukosa (Moreto et

al., 1981) erhöhen. Normalerweise wird Kalium ins Kolon sezerniert. Dieser Prozess wird durch die Laxantien noch mehr verstärkt.
Außerdem wird Wasser und Natrium vermehrt sezerniert, deren Verlust zu einem sekundären Hyperaldosteronismus führen kann, welcher die Hypokaliämie noch weiter verstärkt (Müller-Lissner, 1992). Allerdings kommt es bei Patienten vor, die über viele Jahre Laxantien in hohen Dosen eingenommen haben, und nicht bei obstipierten Patienten, die vernünftige Dosen verbraucht haben (Leng-Peschlow et al., 1993).

Unter dem Begriff Melanosis coli versteht man eine braunschwärzliche Verfärbung der Kolonschleimhaut. Anfangs wurde sie unter Einnahme von Anthranoiden beobachtet (Sleisenger u. Fordtran, 1978; Russel et al., 1980). Später wurde eine Assoziation auch mit anderen Laxantien festgestellt: mit Bisacodyl und Rhizinusöl (Spiessens et al., 1991; Mengs, 1993).
Der Entstehungsmechanismus der Melanose ist komplex und letztendlich noch nicht vollständig geklärt. Die Ausprägung ist am stärksten im Zökum und nimmt nach distal ab, um im Rectum wieder stärker zu werden (Müller-Lissner, 1992). Morphologisch zeigt sich eine Einlagerung von Pigment in den Makrophagen der Kolonschleimhaut (Wittoesch et al., 1958). Eine mögliche Erklärung ist die Apoptose defekter Epithelzellen, die durch Makrophagen aufgenommen werden. Bei der Umwandlung dieser defekten Zellen in den Lysosomen der Makrophagen entsteht ein lipofuszinähnliches Pigment, was die braunschwarze Verfärbung verursacht (Russel, 1980; Walker, 1988).
Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Phänomen reversibel ist. Es tritt innerhalb eines Jahres nach Einnahme von Laxantien auf und verschwindet 6 bis 11 Monate nach Beendigung der Laxantieneinnahme (Speare, 1951).

Über eine mögliche Schädigung des enterischen Nervensystems durch Laxantien liegen widersprüchlige Ergebnisse vor.
Nach einer längerfristigen Einnahme von Anthrachinonen zeigten sich morphologisch Defekte des Plexus myenterikus und submukosus im Mäusekolon (Smith 1968 und 1973; Riemann et al., 1980). Solche Beobachtungen konnten jedoch weder elektronenmikroskopisch (Dufour u. Gendre, 1984; Rudolph u. Mengs, 1988), noch immunhistochemisch bestätigt werden (Kiernan u. Heinicke, 1989). Tierexperimentelle Untersuchungen auf den Gehalt von Neurotransmittern nach einer längerfristigen Einnahme von Laxantien zeigen diskrepante Ergebnisse; Tzavella et al., (1995) beschrieb eine signifikante Reduktion der Neurotransmitter im Rattenkolon; Milner et. al, (1992) konnte keine Veränderung der Neurotransmittergehalte im Rattenzökum feststellen.

Untersuchungen an chronisch obstipierten Patienten mit einer längerfristigen Laxantieneinnahme zeigten ebenfalls widersprüchlige Ergebnisse. So wurden Veränderungen im Plexus myentericus (Krishnamurthy et al., 1985) und Veränderungen des Gehaltes von Neurotransmittern (Tzavella et al., 1996; Sjolund et al., 1997; Khalif et al., 2005) einerseits beschrieben, andererseits zeigten sich keine Veränderungen der submukösen Nervengeflechte nach längerfristiger Laxantieneinnahme im Darm chronisch obstipierter Patienten (Vorderholzer, 2000).
Es gibt sehr wenige Studien, die akute Veränderungen nach einer einmaligen Gabe von Laxantien in der Schleimhaut des Darmes beschreiben. So wurden nach einer einmaligen Gabe von Sennosiden zur Darmvorbereitung histologische Veränderungen im Sinne einer signifikanten Zunahme der Infiltration der Lamina propria mit mononukleären Zellen beobachtet (van Gorkom et al., 1998). Eine vermehrte Ödembildung der Darmschleimhaut verbunden mit einer Reduktion von epithelialen Zellen zeigte sich in Biopsien menschlichen Darmes, die mit einer einmaligen hohen Dosis von Sennosiden zur Darmspiegelung vorbereitet wurden (Poekros et al., 1985). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten kontroverse Ergebnisse. So waren einerseits nach einer einmaligen Gabe von Sennosiden keine lichtmikroskopischen Veränderungen im Rattenkolon zu sehen (Goerg et al., 1980); andererseits zeigte sich eine vermehrte zelluläre Infiltration der Lamina propria im Rattenkolon ebenfalls nach einer einmaligen hohen Dosis von Sennosiden (Geboes et al., 1992). 48 Stunden nach einer hochdosierten Applikation von Laxantien konnten, im Gegensatz zu einer sechsmonatigen Behandlung, keine Veränderungen der Neuropeptidgehalte im Rattencolon beschrieben werden (Tzavella et al., 1995).

5. Zielsetzung

Neuropeptide scheinen eine wesentliche Rolle in der Regulierung der Kolonmotilität zu spielen und können somit als funktionelle Parameter des enterischen Nervensystems herangezogen werden (Long u. Bloom, 1982).
Die meisten Studien über Laxantienwirkungen auf das enterische Nervensystem, die ohnehin wenige in der Anzahl sind, beziehen sich auf die Langzeitwirkung und beschränken sich entweder auf immunhistochemische Untersuchungen (Kiernan u. Heinicke, 1989; Heinicke und Kiernan, 1990) oder ELISA-Technicken (Milner et al., 1992).
In der Studie von Tzavella et al., 1995 fand sich nach einer sechsmonatigen Laxantienbehandlung eine signifikante Reduktion des Gehaltes der beiden inhibitorischen Neurotransmitter VIP und Somatostatin im Rattenkolon; 48 Stunden

nach einer Einzeldosisapplikation dieser Laxantien konnte kein Effekt an dem Gehalt der Neurotransmitter beobachtet werden. Ziel unserer prospektiv randomisierten Studie ist es, mittels validierter Radioimmunoassays (O´Shaugnessy, Long u. Bryant und McGregor 1982) den Akuteffekt auf den Gehalt der inhibitorischen Neurotransmittern VIP und Somatostatin und des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P in den drei Schichten (Mukosa, Submukosa und Muskularis externa) der Rattendarmwand (sowohl des Colon ascendens, als auch des Colon descendens) 2, 6 und 18 Stunden nach einmaliger Applikation von hohen Dosen von Anthrachinonen und diphenolischen Laxantien zu untersuchen.

Als Vertreter der Hauptbestandteile natürlicher Sennalaxantien kamen Sennoside zum Einsatz. Das synthetisch hergestellte Anthrachinonderivat Danthron diente als „Positivkontrolle", von welchem aufgrund der unter 2.1. erwähnten Toxizität ein positiver Effekt in Form einer Erniedrigung der untersuchten Neuropeptidgehalte erwartet wurde. Die diphenolischen Laxantien wurden durch das Bisacodyl und das Natriumpicosulphat vertreten.

II. Versuchstiere, Material und Methoden

1. Versuchstiere

Es wurden weibliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 216 ± 18 g verwendet. Sie wurden unter standardisierten Umweltbedingungen gehalten (Raumtemperatur: 24±1° C, relative Luftfeuchtigkeit: 50± 2%, hell/dunkel Rhythmus: 12/12 Stunden). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und handelsüblicher Rattennahrung.

2. Material, Geräte, Substanzen, Lösungen

2.1. Material

Polystyrol Immunolon Röhrchen, 4ml:
Firma Greiner, München

Röhrchen mit wasserdichtem Schraubverschluss, 10 ml:
Sarstedt, Nümbrecht

2.2. Geräte

Analysenwaage Analytic AC 210S:
Sartorius AG, Göttingen

Heizplatte Ikamag RCT:
IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.

Homogenisator 853202:
B.Braun, Melsungen

Zentrifuge Rotixa/ P:
Hettich, Tuttlingen

Rüttler Typ VF2:
IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.

Membranpumpe MEZ:
Vacuubrand GmbH, Wertheim

Automatic gamma counter 1272 Clinigamma:
LKB Wallac, Pharmacia

2.3. Substanzen

Essigsäure 100% (Eisessig):
Merck, Darmstadt
Bei einem Verhältnis von 30 µl Eisessig pro Milliliter Aqua dest. erhielt man 0,5 M Essigsäure.

- **Laxantien**

Sennoside: natürliche Mischung, mit den Isomeren A und B als vorherrschende Bestandteile; Reinheit > 95%:
Madaus AG, Köln

Danthron:
Sigma Chemie, Deisenhofen

Natriumpicosulfat:
Profarmo Nobel, Mailand Italien

- **Tracer**

(^{125}I)-Tyr^{1}-Somatostatin (NEN),
Molekulargewicht 1854 g/mol

(^{125}I)-Bolton Hunter labeled Lys^3 Substance P (NEN),
Molekulargewicht 1620 g/mol

(^{125}I)-Vasoactive Intesinal Polypeptide (NEN),
Molekulargewicht 3450 g/mol

Alle Tracer hatten eine spezifische Aktivität von 2200 µCi/nmol und wurden von Du Pont/NEN, Dreieich bezogen.

- **Standards und Kontrollen der Neuropeptide**

Die synthetisch hergestellten Peptide Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), Somatostatin und Substanz P (Molekulargewicht, Peptidgehalt und Reinheit siehe Tabelle 2) stammten von Sigma, Deisenhofen, und mussten mit Puffer verdünnt werden (Tabelle 5 und 6), um die benötigten Konzentrationen zu erreichen.

Tabelle 2: Molekulargewicht, Peptidgehalt und Reinheit der Peptide

	VIP	SOM	SP
Molekulargewicht in g/mol	3326	1638	1347,7
Peptidgehalt	82%	89%	85%
Reinheit	98%	99%	98%

2.4. Lösungen

- **PBS (phosphat-buffered-saline) – Puffer**

Zur Herstellung von PBS-Puffer wurden in 1 Liter aqua dest. 8 g NaCl, 0,2 g KCL, 1,44 g $NA_2HPO_4.2H_2O$ und 0,2 g KH_2PO_4 gelöst und mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

- **0,1 M Na-Citrat-Puffer , 0,1 M Na-Phosphat-Puffer**

Diese Puffer wurden als Fertigpuffer aus der Apotheke der Klinik geliefert:
Na-Zitrat-NaOH-Puffer nach Sörensen, 0,1 mol/l, pH 6,5
Na-Phosphat-Puffer, 0,1 mol/l, pH 7,4

Zu jeweils einem Liter dieser Fertigpuffer wurden noch beigefügt:

5g Albumin, bovine (Initial fractionation by cold alcohol pracipitation, RIA Grade, Fraction V, 96-99 % Albumin):
Sigma Chemical Co, St.Louis USA

0,2 g Natriumazid reinst. NaN_3:
Merck, Darmstadt

500.000 KIE Trasylol:
Bayer AG, Leverkusen

50 µl Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate (Tween 20^R):
Sigma Chemical Co, St.Louis USA

- **Antikörpergemische**

Antiseren gegen VIP, Somatostatin und Substanz P (Vgl. dazu 3.4.2).

Doppelbindende Antikörper:
Serva, Darmstadt

Anti-Kaninchen Gammaglobulin:
Serva, Heidelberg

3. Methoden

Das Studienprotokoll wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

3.1. Behandlung der Versuchstiere

Es wurden 450 weibliche Wistar-Ratten 15 Gruppen zu je 30 Tieren pro Gruppe randomisiert zugeteilt. Eine hohe Dosis von Sennosiden, Danthron, Bisacodyl oder Natriumpicosulphat wurde einmalig über eine Magensonde appliziert (Tabelle 3). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten anstelle der Laxantien das Lösungsmittel

Tragacanth (0,5%). Die zugeführten Laxantienmengen wurden so gewählt, dass die Therapie flüssige Stühle zur Folge hatte.
Wegen der deutlich geringeren Aktivität des freien Anthrachinons Danthron musste bei diesem Laxans eine erheblich höhere Dosis eingesetzt werden.

Tabelle 3: Behandlung der Tiere

GRUPPE	BEHANDLUNG	N= Anzahl der Tiere/Gruppe
1 / 6 /11	Lösungsmittel Tragacanth 0,5%	30
2 / 7 /12	Sennoside 40 mg/kg KG	30
3 / 8 / 13	Danthron 500 mg/kg KG	30
4 / 9 / 14	Bisacodyl 50 mg/kg KG	30
5 / 10 / 15	Natriumpicosulfat 10 mg/kg KG	30

2 (Gruppe 1-5) bzw. 6 (Gruppe 6-10) bzw. 18 (Gruppe 11-15) Stunden nach der Applikation des Lösungsmittels bzw. der Laxantien erfolgte die Entfernung von Colon ascendens und Colon descendens in Inhalationsnarkose mit Äther. Die Tötung der Tiere erfolgte im Anschluss an die Darmentnahme schmerzlos in Narkose. Zwei jeweils etwa ein Zentimeter lange Stücke des Colon ascendens (fünf Zentimeter distal des Zökum) und des Colon descendens (fünf Zentimeter proximal vom Rektum) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20°C gelagert.

3.2. Präparation der Darmsegmente

Die Darmsegmente, die einzeln in beschrifteten Probengefäßen bei –20°C gelagert waren, wurden zunächst aufgetaut, bis sie flexibel genug waren, um weiter verarbeitet werden zu können. Alle folgenden Arbeitsschritte mussten unter ständiger Kühlung auf Eis durchgeführt werden, da ein Aufenthalt der Proben in der Wärme, ebenso wie wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren einen Zerfall der temperaturempfindlichen Neuropeptide bewirken können (Bryant u. Bloom, 1982).

Die Präparation der Darmsegmente erfolgte nach einer von Ferri et al. (1983) beschriebenen Methode zur Mikrodissektion von Menschendarmbiopsien, die wie folgt leicht modifiziert wurde (Tzavella et al., 1995). Anfangs wurde das aufgetaute

Kolonsegment mit gekühltem PBS-Puffer benetzt und mit einem ebenfalls mit PBS-Puffer angefeuchtetem Kunststoffstab (Durchmesser etwa fünf Millimeter) sondiert (Abb. 1).

Abb. 1: Dissektion der Kolonsegmente. Man erkennt eine aufgetaute und um einen Kunststoffstab sondierte Darmprobe auf einer mit PBS-Puffer benetzten und eisgekühlten Kunststoffplatte.

Anschließend wurde die Probe grob von Mesenterium- oder Stuhlresten befreit. Im Verlauf wurde das Darmstück mit einem Skalpell in longitudinaler Richtung eröffnet und auf einer durch Eis gekühlten Kunststoffplatte ausgebreitet, sodass die luminale Seite sichtbar wurde. Mit der Längsseite eines Objektträgers wurde das ausgebreitete Darmstück in der Mitte festgehalten. Mit einem zweiten Objektträger, der parallel zum ersten positioniert wurde, konnte durch vorsichtiges Abstreifen die oberste Schicht der Mukosa abgespalten werden. Danach wurde das Darmstück gewendet, sodass die äußere Muskelschicht oberflächlich zu sehen war. Diese wurde in gleicher Weise wie die Mukosa von der darunterliegenden Schicht abgetragen. Durch erneutes Wenden der Probe ließen sich dann die nun oben liegenden Reste der Mukosa mit der Lamina muscularis mukosae von der Submukosa abspalten. Die einzeln gewonnenen Gewebsschichten (Mukosa, Submukosa und Muskularis externa) wurden in getrennt beschrifteten Probengefäßen auf einer Analysenwaage abgewogen. Die Richtigkeit dieser Methode zur Auftrennung der Darmwand in die drei erwähnten Schichten wurde durch lichtmikroskopische Kontrollen bestätigt.

3.3. Peptidextraktion

Die Peptidextraktion wurde in Anlehnung an die von Bryant u. Bloom (1982) und Ferri et al. (1988) beschriebenen Methoden durchgeführt. Den einzelnen Gewebeproben wurden pro Milligramm Gewebe 20 µl einer 0,5 M Essigsäure beigefügt und anschließend 15 Minuten lang in kochendem Wasser erhitzt. Dabei wurden wasserdicht verschließbare Röhrchen verwendet, um einem Entweichen von Essigsäure bzw. einer eventuellen Verunreinigung durch Flüssigkeit aus dem Wasserbad entgegen zu wirken. Nach einer Abkühlphase von 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Homogenisierung der Gewebeproben. Die Homogenate wurden mit 4000 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, die Überstände dekantiert und bis zur radioimmunologischen Bestimmung bei –20°C aufbewahrt.

3.4. Radioimmunologische Bestimmung der Neuropeptide

Der Gehalt der hier untersuchten Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P wurde in jeder Gewebeschicht mittels in unserem Labor etablierter Radioimmunoassays bestimmt. Alle Pipettiervorgänge erfolgten auf Eis, damit einem temperaturbedingten Zerfall der Neuropeptide vorgebeugt wird. Die verschiedenen Substanzen wurden ausschließlich in beschichteten Polystyrolröhrchen zusammenpipettiert, in welchen alle Reaktionsschritte, einschließlich der Aktivitätsmessung der Pellets, erfolgen konnten.

3.4.1. Prinzip eines Radioimmunoassays

Es folgt eine kurze Darstellung der Grundlagen eines Radioimmunoassays (Adrian, 1982).
Das Prinzip beruht auf eine Kompetition radioaktiv markierter und unmarkierter Antigene um ihre spezifischen Antikörper.
Es wurde jeweils eine konstante Menge eines unmarkierten Antigens (Peptid der zu testenden Probe) mit einer bestimmten Anzahl spezifischer Antikörper zusammengebracht (Antikörpergemische), worauf sich ein quantitativer Anteil unmarkierter Antigene an den Antikörper anlagerte. Dazu wurde eine konstante Menge radioaktiv markiertes Antigen (Tracer) hinzugefügt, welches durch individuelle Aktivitätsmessung nach Auspipettieren in Puffer erhalten wurde. Der optimale Bereich für die jeweils eingesetzte Mengen von 100 µl lag empirisch bei 3500 bis 4000 cpm (=Radioaktivität in Impulsen pro Minute); das entspricht einer Menge von etwa 1 fmol Tracer.

Das markierte Antigen verdrängte je nach Konzentration des unmarkierten Antigens letzteres mehr oder weniger wieder aus der Bindung mit dem Antikörper. Der Anteil des an den Antikörper gebundenen, markierten Antigens ist daher umso höher, je niedriger der Gehalt an unmarkiertem Antigen im Testansatz ist. Eine gleichmäßige Verteilung der Antigene (markiert und nicht markiert) an den Antikörper erreichte man dadurch, indem der Testansatz mit einem Rüttler gut durchgemischt wurde. Die Ansätze wurden dann bei 4°C aufbewahrt.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden für Substanz P und 96 Stunden für Somatostatin und VIP erfolgte eine 40minütige Zentrifugation des Ansatzes mit 4000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C. Dadurch ließ sich der an den Antikörper gebundene Anteil des Antigens als fest haftendes Pellet am Boden des Teströhrchens vom ungebundenen Antigenen separieren. Mittels einer Membranpumpe wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Dabei musste streng darauf geachtet werden, dass das Pellet fest am Boden des Röhrchens haften blieb.
Die Radioaktivität der gebundenen Fraktion im Pellet wurde mit Hilfe eines Gamma-Counters ermittelt.
Der Neuropeptidgehalt der Testproben wurde anhand einer mit bekannten Peptidkonzentrationen erstellten Standardkurve errechnet. Dadurch erhielt man Zwischenergebnisse in der Dimension pmol/l. Durch Multiplikation dieser Werte mit 0,02 l/g, was zur Korrektur der Gewebeverdünnung mit Essigsäure während der Peptidextraktion diente, ergab sich der jeweilige Neuropeptidgehalt in pmol/g Feuchtgewicht.

3.4.2. Assay-Ansätze für die Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P

- **Antikörpergemische**

Das Antiserum zur Erkennung der C-terminalen Sequenz (SU_2IV, Keff=2,84*10^{11} l/mol) von Substanz P wurde durch mehrfache subkutane Injektion synthetischer Substanz P –gebunden an bovines Serumalbumin- in Kaninchen aus dem Serum dieser Tiere gewonnen.
Das Antiserum wies eine Kreuzreaktivität von 11,8% mit Neurokinin A und 10% mit Neurokinin B, jedoch keine mit Substanz P_{1-4}, Peptiden der Sekretin-Glukagon-Familie, PP, NPY, PYY, sulfatiertem CCK-8 und CCK-33, Gastrin-17(I), Gastrin-34(I), Neurotensin, Somatostatin-14 und Somatostatin-28 auf. (Tzavella et al., 1995)
Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Bezeichnung Substanz P anstelle des

korrekten Ausdruckes „Supstanz P-ähnliche Immunreaktivität" verwendet, welcher die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Neurokinin A und B beinhalten würde.
Die VIP- und Somatostatin-Antiseren wurden in analoger Weise wie bei Substanz P gewonnen.
Das VIP-Antiserum (VIP-2-X, Keff=1,0*10^{11} l/mol) zeigte keine Kreuzreaktivität mit VIP_{1-12}, anderen Peptiden der Sekretin-Glukagon-Familie oder Somatostatin-14 (Riepl et al., 1994).
Das Antiserum gegen Somatostatin-14 (SOM-4-VIII, Keff=1,1*10^{11} l/mol) wies eine Kreuzreaktivität von 80% mit Somatostatin-28, aber keine mit Gastrin-17(I), Gastrin-34(I), sulfatiertem CCK-8 und CCK-33, Peptiden der Sekretin-Glukagon-Familie, PP, PYY, und NPY auf (Riepl et al., 1994).

Das Antikörpergemisch setzte sich aus den jeweiligen Antiseren, aus doppelbindenden Antikörpern (DAB) und, aus Gründen maximaler Präzipitation, aus Anti-Kaninchen Gamma-Globulin (120 μg/ml) zusammen.

Tabelle 4: Verdünnungsstufen der Antiseren und doppelbindenden Antikörpern (DAB) der jeweiligen Antikörpergemische.

	VIP	Somatostatin	Substanz P
Antiserum	1:150.000	1:180.000	1:40.000
DAB	1:30	1:40	1:40

Die Verdünnungen erfolgten für VIP und Somatostatin in Zitratpuffer und für Substanz P in Phosphatpuffer.

- **Standardkurven**

Die Standardkurven wurden mit den entsprechenden Standards in aufsteigender Konzentration auspipettiert. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen, welche man durch Verdünnung des entsprechenden synthetischen Peptids in Puffer erhielt, sind für alle drei Peptide in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Konzentrationen der Standardkurven in pmol/l.

VIP	Somatostatin	Substanz P
1,6	1,5	1,8
3,2	3,1	3,6
6,4	6,2	7,2
13,5	12,4	14,4
27,0	24,8	28,7
54,0	50,0	57,5
108,0	99,0	114,9
217,0	198,0	229,9

Zusätzlich waren noch sog. Nullstandards, d.h. peptidfreier Puffer, der nur Antikörper und Tracer enthielt, nötig. Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung (NSB) der radioaktiv markierten Peptide wurde nur Puffer, ohne Zusatz von Antikörpergemisch, eingesetzt.

Zur Evaluation der intra-assay Variation und der inter-assay Variation wurden Kontrollen, die aus den jeweiligen synthetisch hergestellten Peptiden durch Pufferzusatz auf die in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen auspipettiert waren, eingesetzt.

Tabelle 6: Konzentrationen der Kontrollen in pmol/l.

	VIP	Somatostatin	Substanz P
Niedrig	5,0	5,0	
Mittel	50,0	20,0	26,0
Hoch	200,0	150,0	52,0

Alle Proben wurden in zwei Verdünnungsstufen (Tabelle 7) mit je einem Doppelwert angesetzt. Für die Bestimmungen von VIP und Somatostatin erfolgte die Verdünnung der Probe in Zitratpuffer und für die Bestimmung von Substanz P in Phosphatpuffer.

Tabelle 7: Verdünnungsstufen der Proben.

VIP	Somatostatin	Substanz P
1:600	1.:200	1:20
1:300	1:100	1:10

Wegen der sehr niedrigen Substanz P-Gehalte in der Mukosa beider Kolonabschnitte wurden für diese Schicht Verdünnungen von 1:10 und 1:20 eingesetzt.

Das Pipettierschema für alle drei Assays sah zusammengefasst wie folgt aus:

Tabelle 8: Pipettierschema.

	VIP	SOMATOSTATIN	SUBSTANZ P
Standard oder Kontrolle oder Puffer	400 µl	300 µl	200 µl
Antikörpergemisch	100 µl	100 µl	100 µl
Tracer	100 µl	100 µl	100 µl
Puffer	-	100 µl	200 µl
Endvolumen	600 µl	600 µl	600 µl

Bei Somatostatin-Assay und VIP-Assay wurde Zitratpuffer und beim Substanz P-Assay Phosphatpuffer verwendet.

Für den Ansatz der Nullstandards wurden jeweils 400 µl Puffer, 100 µl Antikörpergemisch und 100 µl Tracer benutzt. Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung wurde 500 µl Puffer und 100 µl Tracer eingesetzt.

3.4.3. Berechnung der Neuropeptidkonzentrationen

Die spezifische Bindung ergab sich aus dem Quotienten der mittleren Radioaktivität des Nullstandards (B_0) durch die gesamte Radioaktivität des Tracers (jeweils abzüglich der unspezifischen Bindung).

Nach Subtraktion der NSB-Aktivität konnte die mittlere Radioaktiviät von Standards und Proben (B) sowie der Nullstandards (B_0) bestimmt und der Quotient aus B/B_0 berechnet werden:

B/B_0=Mittelwert (cpmx- cpmNSB)/Mittelwert (cpm B_0-cpmNSB)

Die B/B_0-Werte aller Standards wurden in einem linear-logarithmischen Koordinatensystem gegen die Peptidgehalte aufgetragen. Es resultierte eine sigmoide Standardkurve, aus der man die Peptidspiegel der Testproben mit Hilfe eines elektronischen Rechners ermitteln konnte (Abb. 2-4).
Die untere Nachweisgrenze lag für Substanz P bei 1,3 pmol/l und für Somatostatin und VIP jeweils bei 1,0 pmol/l.

Der intra-assay Variationskoeffizient lag für VIP bei 13,3%, 13,4% und 9,9% für jeweils 3,0, 15,7 und 51,3 pmol/l, der inter-assay Variationskoeffizient lag bei 15,3% und 13,9% für 12,4 und 27,4 pmol/l.

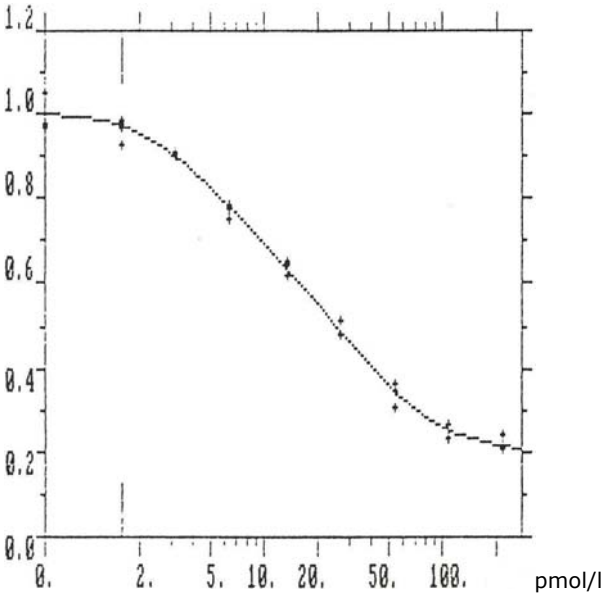


Abb. 2: VIP-Standardkurve zur radioimmunologischen Bestimmung von VIP in den Gewebeschichten.

Der intra-assay Variationskoeffizient für Somatostatin war 14,8% und 7,8% für 2,7 und 15,4 pmol/l, der inter-assay Variationskoeffizient lag bei 11,1% und 7% für 12,6 und 64,1 pmol/l.

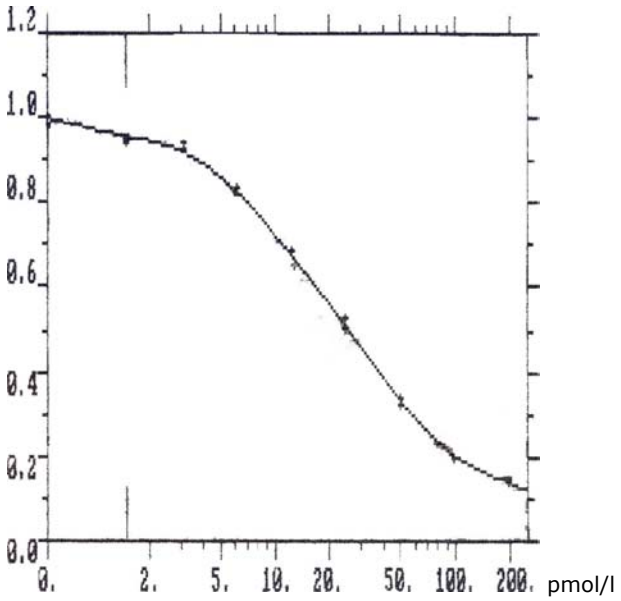


Abb. 3: Somatostatin-Standardkurve zur radioimmunologischen Bestimmung von Somatostatin in den Gewebeschichten.

Der intra-assay Variationskoeffizient für Substanz P lag bei 4,86% und 7,23% für 25,9 und 51,7 pmol/l, der inter-assay Variationskoeffzient lag jeweils bei 10,3% und 7,23%.

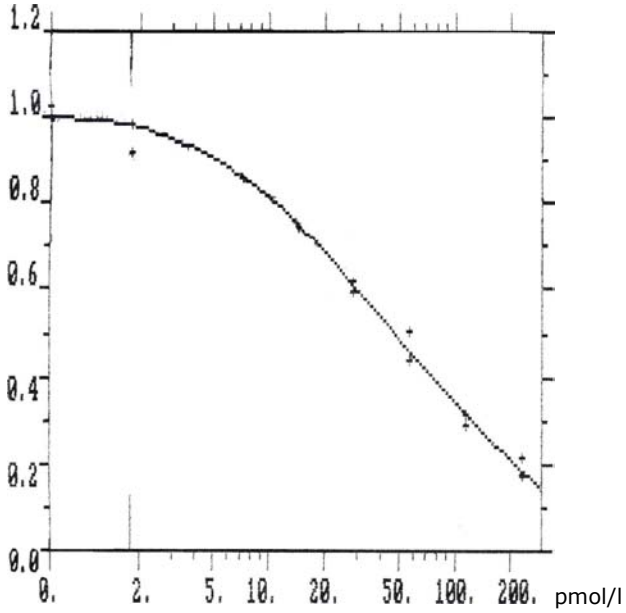


Abb. 4: Substanz P-Standardkurve zur radioimmunologischen Bestimmung von Substanz P in den Gewebeschichten.

3.5. Statistische Auswertung

Für jedes Peptid wurden 5400 Proben (450 Tiere x 2 Kolonsegmente x 3 Schichten x 2 Verdünnungen) in Doppelwerten gemessen. Diese Proben unterwarf man einer Randomisierung in Gruppen von je 100, welche täglich bearbeitet wurden. Der Untersucher war hinsichtlich der Behandlung der Tiere blind, um einer denkbaren subjektiven Einflussnahme auf die Ergebnisse entgegenzuwirken.

Die Ergebnisse der Radioimmunassays wurden als Median/Range oder Median/25. oder 75. Perzentile („Boxplots") aufgetragen. Jede behandelte Gruppe wurde mit der Kontrollgruppe verglichen, indem die Werte dem Kruskal-Wallis Test unterzogen wurden. Im Falle einer Signifikanz führte man für diese Werte zusätzlich den nicht-parametrischen Mann-Whithney U-Test für unabhängige Stichproben durch. Alle Werte für $p < 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

III. Ergebnisse

1. Verteilung der untersuchten Neuropeptide bei den Kontrolltieren

Insgesamt wiesen alle Tiergruppen ein ähnliches Verteilungsmuster der drei bestimmten Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P in den entsprechenden Schichten beider Darmabschnitte auf.

So ließen sich VIP und Somatostatin in allen drei Schichten des Colon ascendens und Colon descendens nachweisen (Tabellen 9-14).

Der Gehalt von VIP war am höchsten in der Mukosa und in der Submukosa des Colon ascendens, gefolgt von den Konzentrationen in der Muskularis externa beider Darmsegmente. Relativ hohe Mengen waren auch in den übrigen Darmschichten beider Kolonsegmente nachzuweisen (Tabellen 9-11).

Hohe Somatostatinmengen fanden sich in der Mukosa und Submukosa des Colon ascendens. Geringere Mengen waren in der Mukosa und Submukosa des Colon descendens, sowie in der Muskularis beider Kolonabschnitte lokalisiert (Tabellen 12-14).

Substanz P war vorwiegend in der Muskularis externa, zu geringeren Anteilen auch in der Submukosa beider Darmsegmente lokalisiert. Nur minimale Mengen, welche unter der radioimmunologischen Nachweisgrenze oder um diese Grenze lagen, konnten in der Mukosa beider Darmabschnitte erkannt werden (Tabellen 15-17).

Tabelle 9: VIP-Gehalt im Rattenkolon 2 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis Externa
Kontrollen	179,169 (137,169-267,999)	261,115 (161,963-458,592)	92,005 (56,721-152,156)
Sennoside	175,636 (106,518-238,443)	250,846 (194,376-334,565)	111,540 (77,886-166,670
Danthron	171,499 (135,447-201,602)	260,508 (195,944-363,882)	82,149 (56,216-120,570)
Bisacodyl	148,203 (104,790-224,335)	228,994 (119,978-335,650)	84,382 (58,695-130,622)
Natrium-Picosulphat	163,156 (108,183-295,710)	247,462 (187,739-331,328)	83,544 (52,188-138,062)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis Externa
Kontrollen	86,368 (50,375-136,160)	58,000 (38,889-85,940)	96,931 (68,186-153,858)
Sennoside	88,630 (54,096-110,288)	55,306 (34,206-67,955)	116,014 (87,618-147,627)
Danthron	88,599 (68,633-115,329)	62,803 (49,803-140,240)	107,643 (84,573-151,814)
Bisacodyl	97,546 (64,509-134,040)	43,258 (34,251-61,362)	118,695 (87,644-141,546)
Natrium-Picosulphat	80,967 (66,327-109,068)	53,248 (36,149-69,818)	123,219 (105,021-154,386)

Tabelle 10: VIP-Gehalt im Rattenkolon 6 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis Externa
Kontrollen	179,014 (126,432-273,854)	256,692 (182,279-301,662)	99,642 (60,698-155,321)
Sennoside	239,445 (166,289-360,681)	218,34 (172,595-301,343)	13,573 (74,177-142,238)
Danthron	234,069 (168,818-293,375)	316,477 (220,400-403,019)	108,388 (71,675-154,554)
Bisacodyl	224,562 (183,929-308,364)	298,936 (153,575-399,090)	115,276 (83,643-201,533)
Natrium-Picosulphat	196,168 (138,599-270,525)	280,033 (199,007-354,884)	113,836 (59,357-137,406)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis Externa
Kontrollen	99,465 (71,495-128,543)	57,937 (37,205-93,180)	111,15 (92,130-164,690)
Sennoside	87,222 (64,130-143,363)	48,516 (32,742-71,433)	106,390 (90,363-139,089)
Danthron	96,681 (75,765-144,738)	67,443 (51,369-96,489)	117,207 (98,189-200,096)
Bisacodyl	117,849 (80,190-184,041)	53,577 (28,496-87,741)	95,712 (161,760)
Natrium-Picosulphat	111,742 (91,880-141,768)	60,372 (44,726-84,731)	135,982 (107,109-141,203)

Tabelle 11: VIP-Gehalt im Rattenkolon 18 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis Externa
Kontrollen	183,829 (137,645-297,479)	192,954 (123,665-416,220)	109,288 (66,498-241,175)
Sennoside	203,382 (143,466-251,583)	240,355 (131,895-342,750)	119,628 (70,484-169,206)
Danthron	193,474 (130,541-265,991)	220,630 (146,916-278,883)	97,921 (53,754-133,106)
Bisacodyl	167,523 (115,875-223,550)	237,489 (109,145-373,142)	85,201 (69,977-113,955)
Natrium-Picosulphat	178,716 (138,749-232,191)	221,353 (171,624-299,487)	88,098 (54,840-110,378)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	99,763 (62,318-230,483)	62,823 (34,784-188,768)	162,879 (102,605-253,760)
Sennoside	101,647 (76,196-135,410)	51,492 (29,580-72,432)	125,644 (100,026-158,286)
Danthron	95,994 (74,445-118,804)	48,438 (37,113-81,484)	116,683 (97,867-144,345)
Bisacodyl	102,711 (75,996-132,856)	51,525 (41,886-87,279)	111,201 (90,249-127,086)
Natrium-Picosulphat	94,086 (67,552-119,67)	54,897 (37,599-71,401)	108,100 (85,003-146,599)

Tabelle 12: Somatostatin-Gehalt im Rattenkolon 2 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis Externa
Kontrollen	52,431 (37,977-78,018)	109,154 (85,531-151,790)	12,899 (8,983-21,405)
Sennoside	51,213 (39,455-74,566)	109,235 (88,154-163,572)	17,880 (13,711-21,808)
Danthron	55,443 (42,128-68,944)	97,714 (56,835-126,195)	15,986 (11,351-20,248)
Bisacodyl	51,644 (36,538-72,791)	95,834 (42,486-187,825)	14,922 (10,776-20,316)
Natrium-Picosulphat	61,255 (47,651-83,308)	101,657 (75,577-137,501)	13,861 (10,814-18,020)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	24,041 (15,005-28,423)	21,978 (15,696-33,412)	3,171 (1,586-10,212)
Sennoside	22,868 (15, 754-35,118)	23,213 (18,322-38,877)	6,146 (3,252-9,621)
Danthron	24,222 (16,458-29,093)	23,978 (16,876-31,677)	5,796 (0-7826)
Bisacodyl	21,489 (12,698-32,258)	21,421 (14,784-25,203)	3,633 (1,067-8,495)
Natrium-Picosulphat	21,095 (13,414-31,300)	19,720 (14,505-29,201)	3,883 (0-7,297)

Tabelle 13: Somatostatin-Gehalt im Rattenkolon 6 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	53,62 (38,422-78,196)	105,440 (79,114-137,430)	13,041 (9,148-19,126)
Sennoside	60,828 (43,851-85,103)	82,918 (60,023-109,366)	12,134 (8,457-23,854)
Danthron	59,283 (46,897-76,672)	102,289 (66,348-129,830)	14,230 (10.463-21,216)
Bisacodyl	71,763 (56,064-89,420)	101,696 (71,502-137,099)	18,701 (13,434-25,264)
Natrium-Picosulphat	77,962 (51,358-94,153)	100,871 (173,329-128,734)	18,685 (13,226-23,653)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	19,869 (15,580-31,640)	21,79 (14,873-32,992)	2,244 (0-5,528)
Sennoside	23,438 (18,391-32,274)	19,181 (11,297-28,498)	1,458 (0-10,096)
Danthron	25,673 (19,834-34,996)	21,617 (15,519-32,051)	4,731 (0-9,417)
Bisacodyl	27,388 (21,321-36,975)	24,312 (19,220-35,707)	5,262 (1,838-11,814)
Natrium-Picosulphat	26,134 (22,083-36,124)	20,788 (15,447-28,752)	6,523 (3,474-8,845)

Tabelle 14: Somatostatin-Gehalt im Rattenkolon 18 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	58,092 (42,815-71,014)	85,603 (54,691-124,678)	17,300 (12,026-24,804)
Sennoside	65,571 (46,667-82,561)	95,639 (62,627-121,261)	14,964 (9,993-18,982)
Danthron	53,156 (43,556-72,224)	86,251 (63,689-128,607)	12,202 (8,758-16,251)
Bisacodyl	61,066 (40,818-72,316)	97,235 (62,660-137,155)	13,024 (10,253-16,484)
Natrium-Picosulphat	64,000 (54,678-79,854)	101,367 (77,303-148,756)	14,517 (9,692-19,272)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	21,865 (17,493-30,742)	22,897 (16,496-30,221)	5,396 (0-9,424)
Sennoside	21,528 (16,722-27,860)	14,62 (10,766-10,224)	3,32 (0,956-6,400)
Danthron	22,137 (17,849-29,838)	19,941 (15,060-30,965)	6,229 (3,203-9,042)
Bisacodyl	23,846 (17,451-30,012)	17,492 (15,391-27,552)	6,423 (3,548-10,002)
Natrium-Picosulphat	26,178 (18,781-32,334)	19,505 (13,743-27,444)	5,09 (2,202-9,139)

Tabelle 15: Substanz P-Gehalt im Rattenkolon 2 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	0,215 (0-0,580)	2,116 (1,246-3,360)	9,337 (7,483-13,989)
Sennoside	0,267 (0,010-0,450)	1,439 (0,982-2,539)	9,380 (7,416-11,422)
Danthron	0,324 (0-1,059)	1,949 (1,458-2,592)	8,972 (7,236-12,620)
Bisacodyl	0,137 (0-0,879)	1,629 (0,941-3,404)	10,532 (5,664-13,059)
Natrium-Picosulphat	0,318 (0,020-0,829)	2,002 (0,898-3,451)	9,097 (7,115-12,378)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	0,124 (0-0,647)	1,016 (0,401-1,789)	7,171 (3,702-10,047)
Sennoside	0,108 (0-0,339)	1,176 (0,837-1,665)	7,322 (5,321-9,861)
Danthron	0,259 (0-0,649)	1,025 (0,408-1,558)	7,566 (5,542-9,647)
Bisacodyl	0 (0-0,386)	0,843 (0,545-1,377)	6,484 (4,161-10,773)
Natrium-Picosulphat	0,166 (0-0,750)	0,902 (0,512-1,243)	7,890 (5,835-9,886)

Tabelle 16: Substanz P-Gehalt im Rattenkolon 6 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	0,224 (0-0,662)	1,498 (0,912-2,206)	9,047 (7,301-13,072)
Sennoside	0,408 (0-0,834)	1,656 (0,978-2,560)	11,163 (8,958-15,348)
Danthron	0,389 (0,061-0,623)	1,528 (0,848-2,506)	8,064 (6,450-10,108)
Bisacodyl	0,203 (0-0,649)	1,800 (1,215-2,893)	8,739 (6,947-12,185)
Natrium-Picosulphat	0,517 (0,093-0,972)	2,665 (1,908-3,505)	10,412 (6,932-16,586)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	0,216 (0-0,577)	1,163 (0,655-1,940)	8,547 (4,715-11,078)
Sennoside	0,261 (0-0,601)	1,024 (0,642-1,521)	8,027 (5,597-10,458)
Danthron	0,254 (0,018-0,508)	1,483 (0,562-2,950)	7,774 (5,711-11,321)
Bisacodyl	0,089 (0-0,486)	1,013 (0,485-1,737)	8,566 (5,914-11,610)
Natrium-Picosulphat	0,273 (0-0,444)	0,808 (0,446-1,595)	8,276 (5,822-10,594)

Tabelle 17: Substanz P-Gehalt im Rattenkolon 18 Stunden nach Einzeldosiszufuhr von Sennosiden (40 mg/kg), Danthron (500 mg/kg), Bisacodyl (50 mg/kg) und Na-Picosulphat (10 mg/kg), angegeben in pmol/g Feuchtgewicht als Median (Range).

Colon ascendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	0,157 (0-0,593)	1,498 (1,178-3,651)	8,187 (6,541-13,186)
Sennoside	0,115 (0-0,584)	1,505 (0,996-3,315)	7,759 (6,239-11,337)
Danthron	0,315 (0-0,924)	1,439 (1,146-2,908)	9,373 (6,559-16,238)
Bisacodyl	0,283 (0-0,792)	2,170 (1,502-3,218)	9,221 (7,631-14,448)
Natrium-Picosulphat	0,345 (0-0,883)	1,575 (1,121-2,593)	8,369 (5,812-10,340)

Colon descendens	Mukosa	Submukosa	Muskularis externa
Kontrollen	0,196 (0-0,577)	0,968 (0,335-1,906)	7,497 (4,913-10,739)
Sennoside	0 (0-0,155)	0,659 (0,279-1,232)	5,859 (3,874-9,052)
Danthron	0,224 (0-1,089)	1,315 (0,307-2,344)	7,002 (4,681-13,414)
Bisacodyl	0,072 (0-0,294)	0,862 (0,682-1,396)	7,718 (5,606-9,265)
Natrium-Picosulphat	0,138 (0-0,427)	0,961 (0,482-1,631)	7,978 (5,613-9,595)

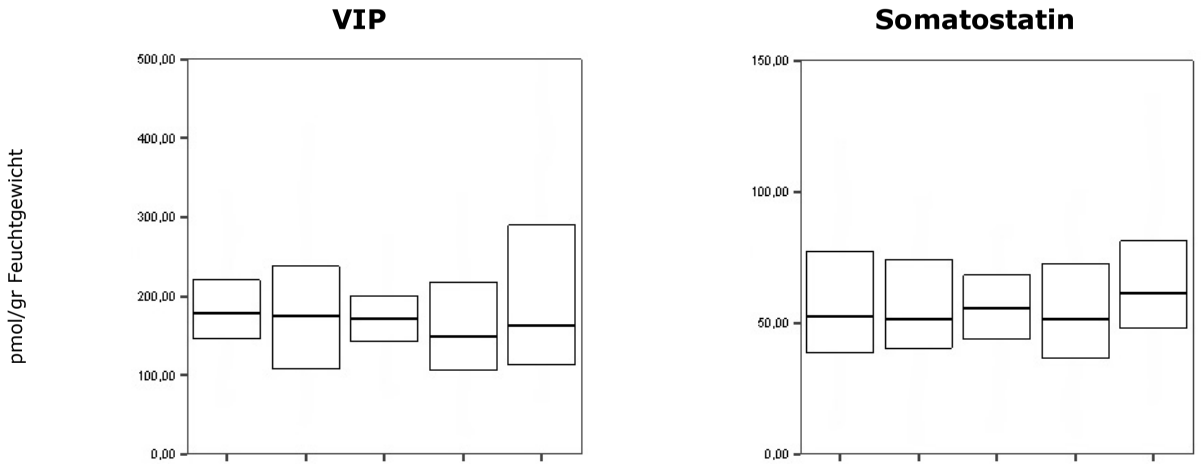
2. Akuteffekt der Laxantienbehandlung auf die Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P

2.1. 2 Stunden nach der Einzeldosisbehandlung mit Laxantien

2 Stunden nach Verabreichung einer hohen Einzeldosis von Sennosiden, Danthron, Bisacodyl und Na-Picosulphat waren – verglichen mit den Kontrolltieren – in keiner der drei untersuchten Schichten (Mukosa, Submukosa und Muskularis externa) von Colon ascendens und Colon descendens signifikante Einflüsse auf den Gehalt von VIP, Somatostatin und Substanz P feststellbar (Tabellen 9, 12 und 15, Abb. 5-7). Da Substanz P in der Mukosa beider Kolonabschnitte unter der Nachweisgrenze lag, wurde auf die graphische Darstellung dieser Werte verzichtet.

Abb. 5: Gehalt von **VIP** und **Somatostatin** in der **Mukosa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **2 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens

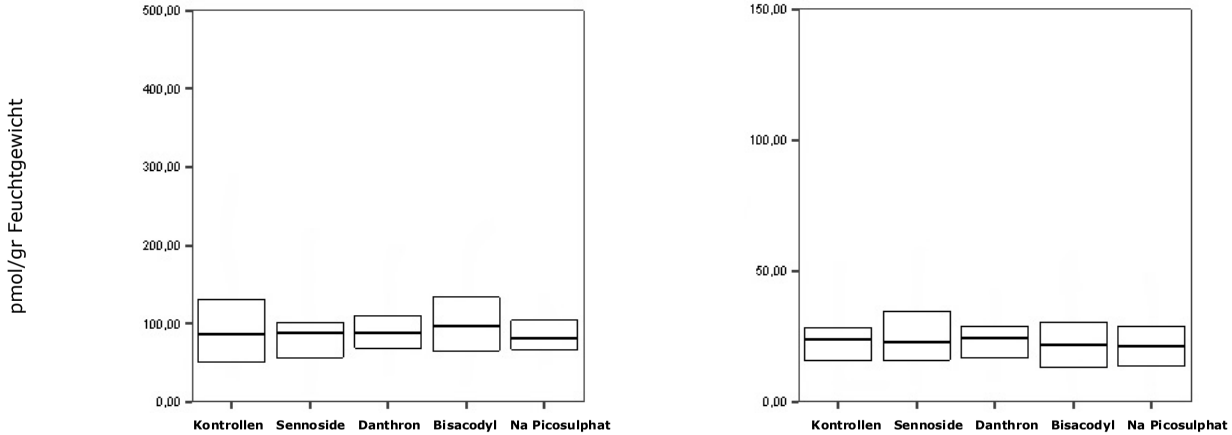
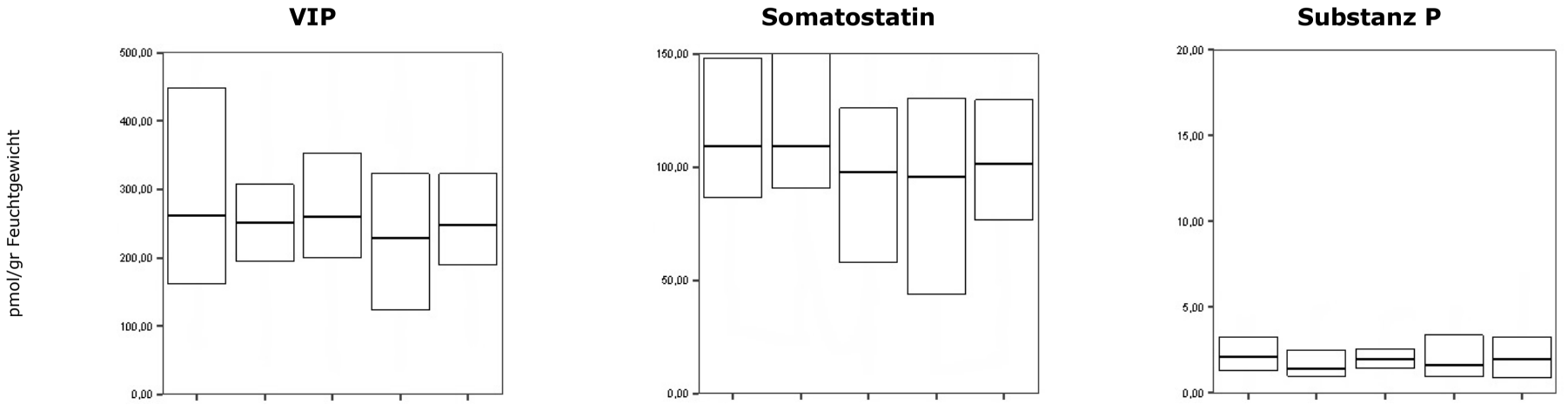


Abb. 6: Gehalt von **VIP**, **Somatostatin** und **Substanz P** in der **Submukosa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **2 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens

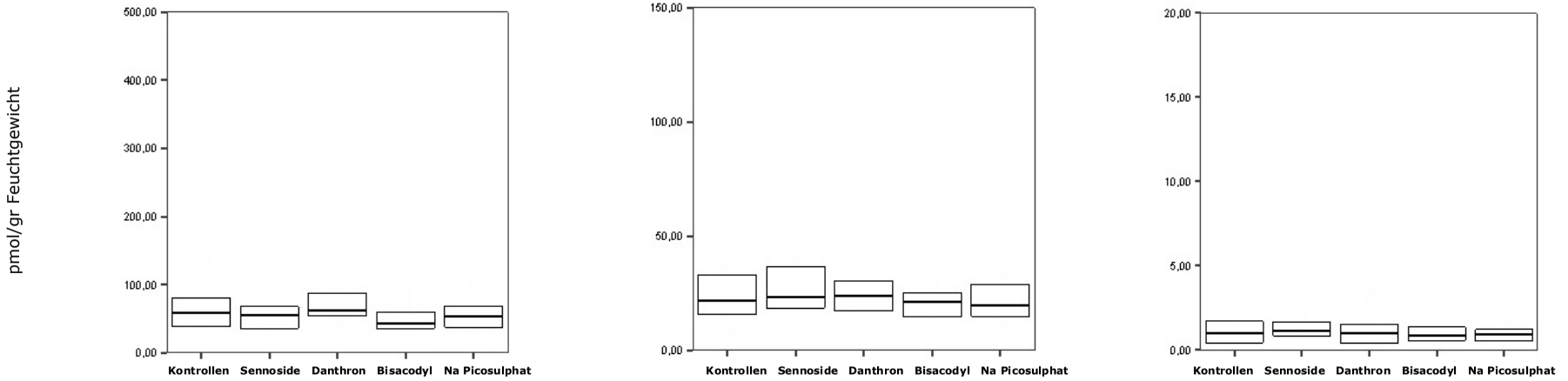
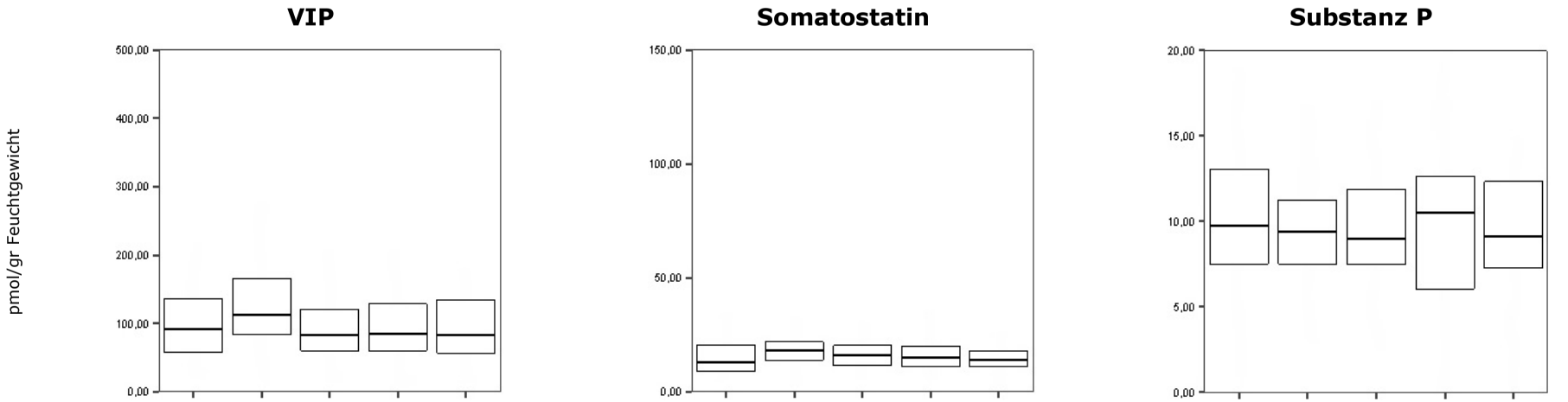
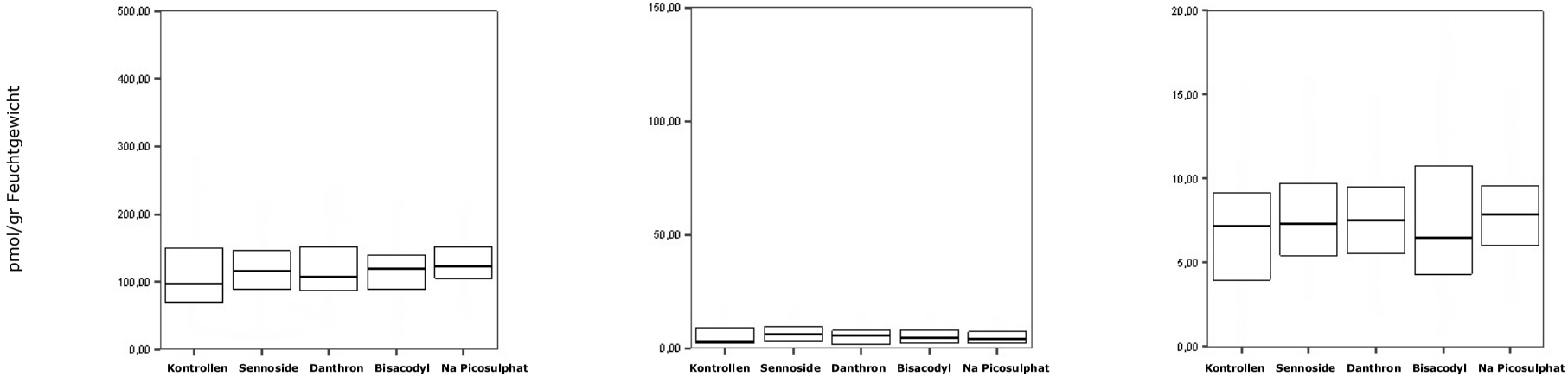


Abb. 7: Gehalt von **VIP**, **Somatostatin** und **Substanz P** in der **Muskularis externa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **2 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens



2.2. 6 Stunden nach der Einzeldosisbehandlung mit Laxantien

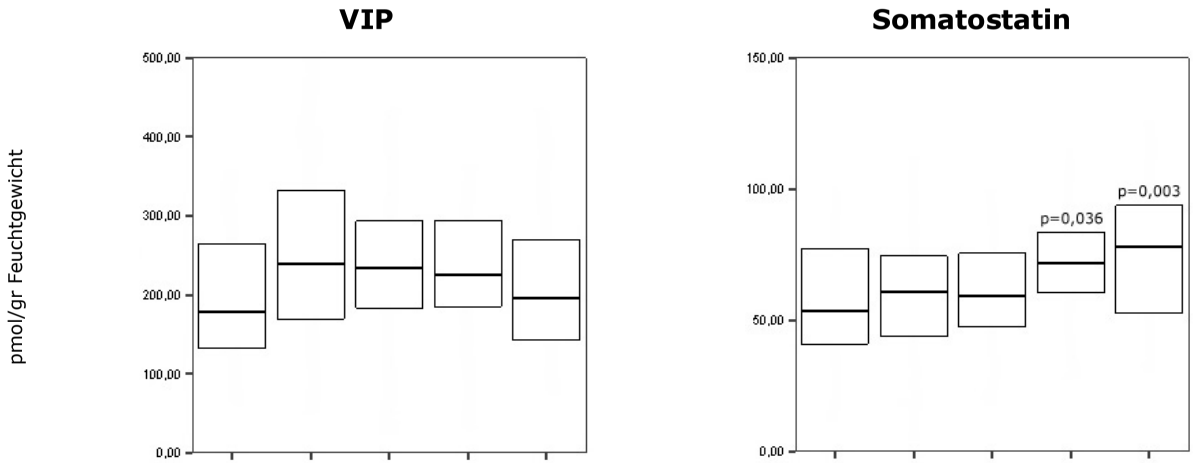
VIP: 6 Stunden nach Verabreichung einer hohen Dosis von Sennosiden, Danthron, Bisacodyl und Natriumpicosulphat war keine Veränderung des VIP-Gehaltes in der Mukosa, Submukosa und Muskularis externa des Colon ascendens und Colon descendens nachzuweisen (Abb. 8-10)

Somatostatin: 6 Stunden nach der Gabe einer hohen Dosis Bisacodyl und Natriumpicosulphat ließ sich im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Erhöhung des Somatostatingehaltes in der Mukosa und Muskularis externa des Colon ascendens und in der Muskularis externa des Colon descendens nachweisen. In der Submukosa des Colon ascendens blieb der Somatostatingehalt unverändert.
Die Verabreichung hoher Dosis von Sennosiden und Danthron zeigte nach 6 Stunden keine Veränderung des Gehaltes von Somatostatin in der Mukosa, Submukosa und Muskularis externa des Colon ascendens und descendens (Abb. 8-10).

SP: 6 Stunden nach der Gabe einer hohen Dosis von Natriumpicosulphat ließ sich im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Erhöhung des SP-Gehaltes in der Submukosa des Colon ascendens nachweisen.
Die Verabreichung hoher Dosis von Sennosiden, Danthron und Bisacodyl ließ den Gehalt von SP in der Mukosa, Submukosa und Muskularis externa des Colon ascendens und Colon descendens unbeeinflußt.
Wegen extrem niedriger Werte des SP-Gehaltes in der Mukosa beider Darmsegmente wurde auf eine graphische Darstellung dieser Werte verzichtet (Abb. 9-10).

Abb. 8: Gehalt von **VIP** und **Somatostatin** in der **Mukosa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **6 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens

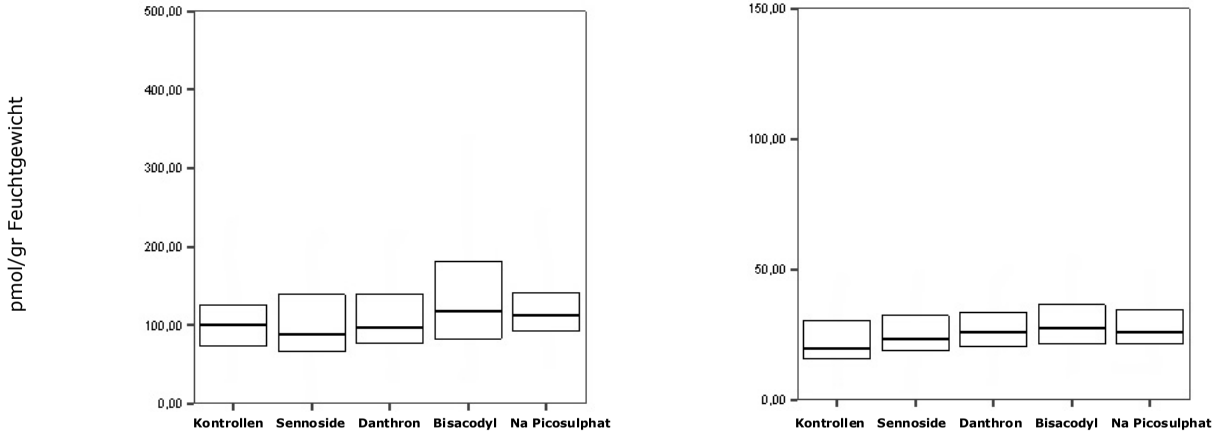
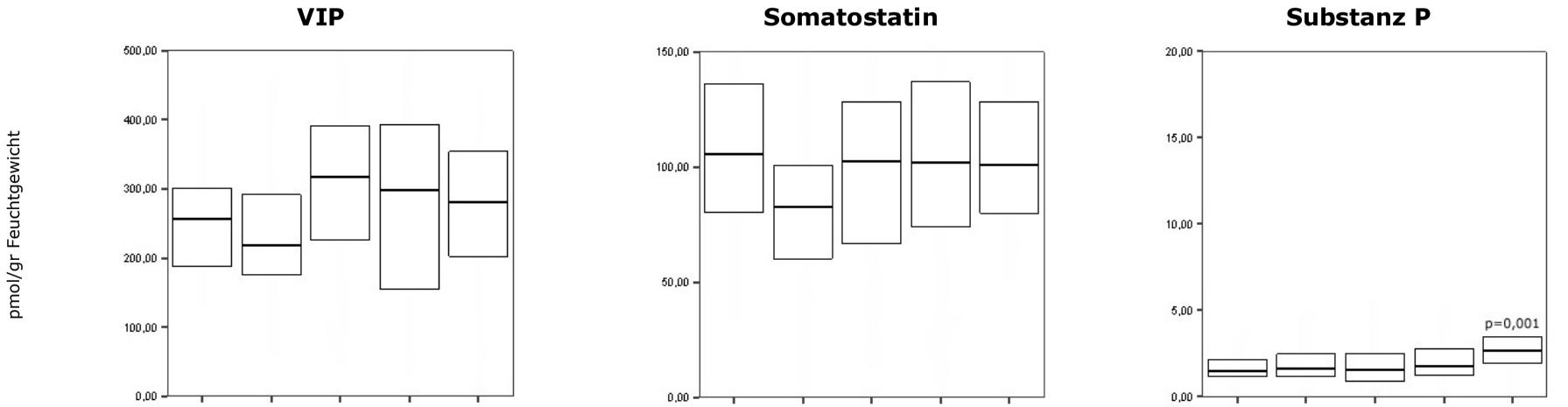


Abb. 9: Gehalt von **VIP**, **Somatostatin** und **Substanz P** in der **Submukosa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **6 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens

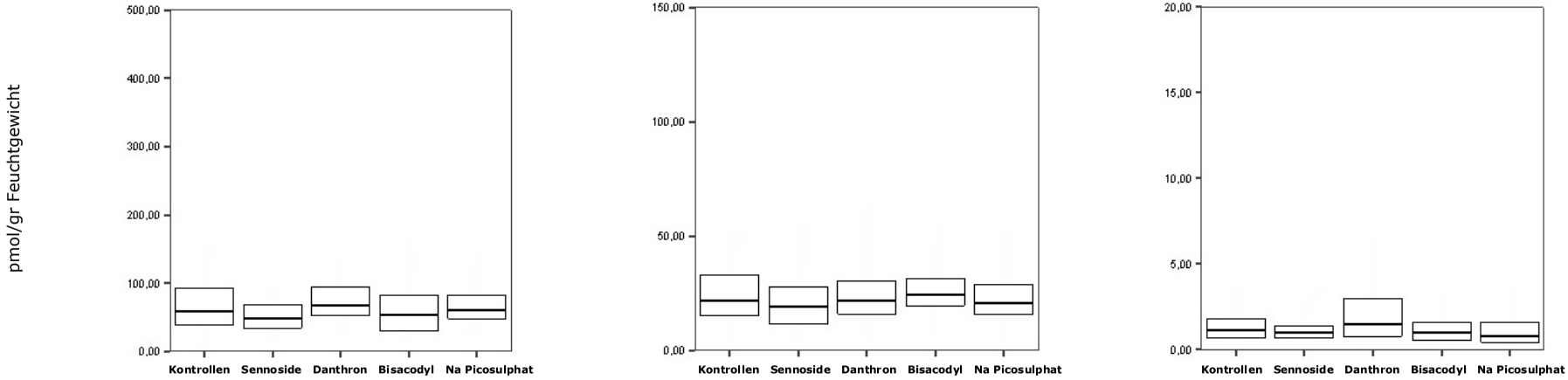
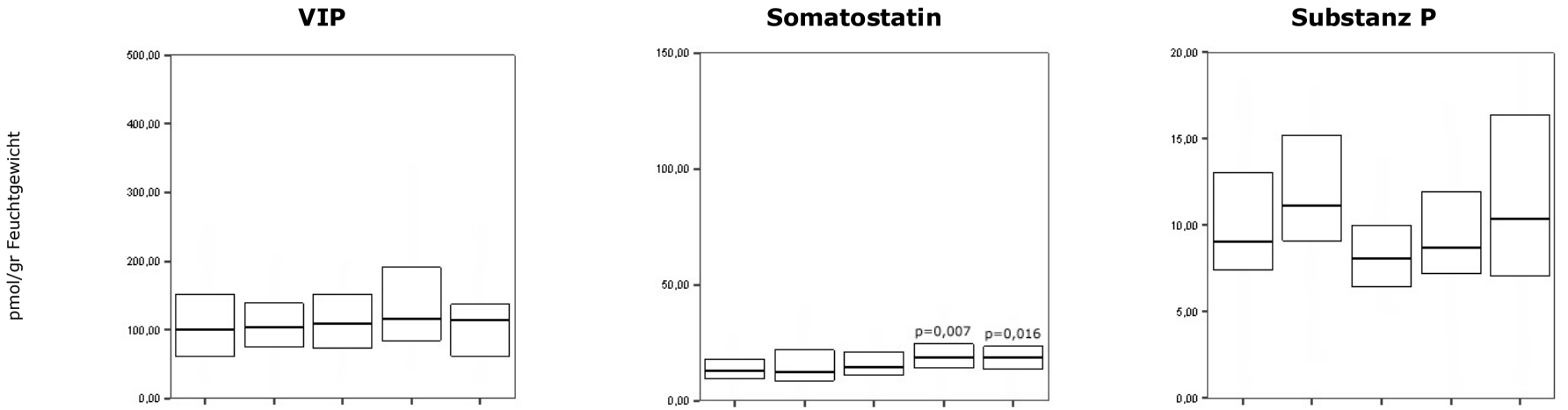
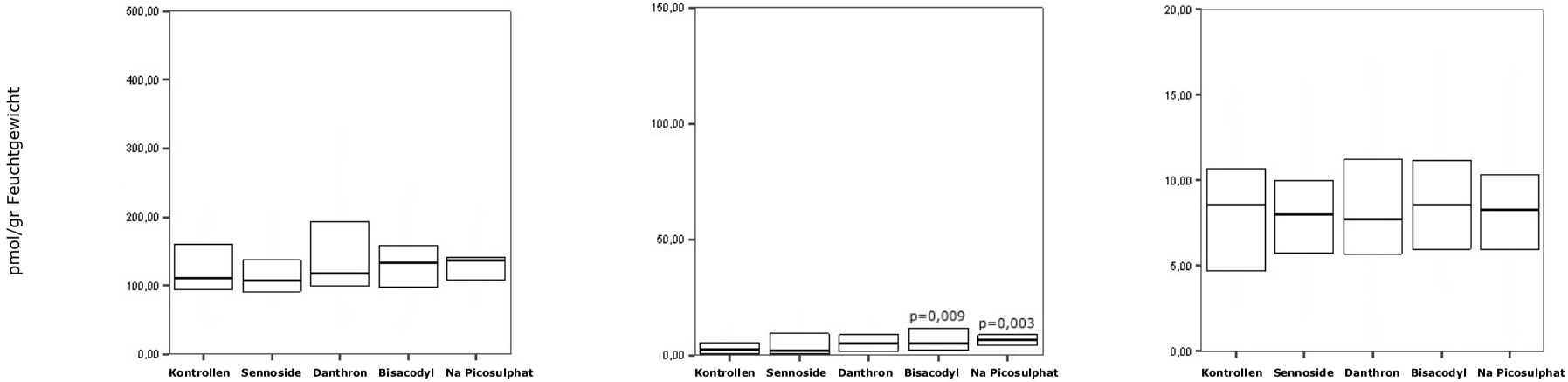


Abb. 10: Gehalt von **VIP**, **Somatostatin** und **Substanz P** in der **Muskularis externa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **6 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens



2.3. 18 Stunden nach Einzeldosisbehandlung mit Laxantien

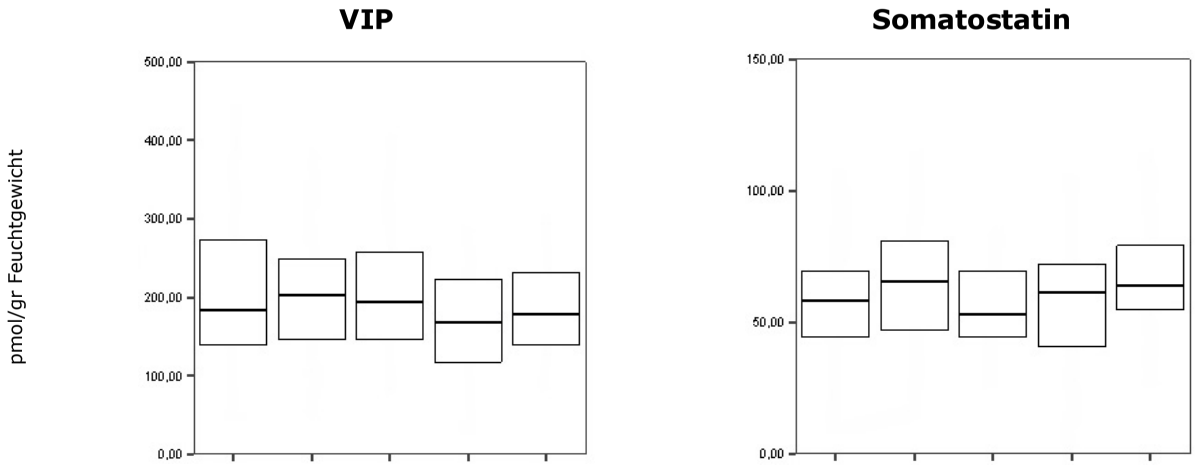
VIP: 18 Stunden nach Verabreichung einer hohen Einzeldosis von Bisacodyl und Natriumpicosulphat, aber auch von Danthron ließ sich eine Reduktion des VIP-Gehaltes in der Muskularis externa des Colon descendens nachweisen.
In den übrigen Schichten des Colon descendens (Mukosa und Submukosa) und in den drei Schichten des Colon ascendens (Mukosa, Submukosa und Muscularis extena) fanden sich 18 Stunden nach der Einzeldosisbehandlung mit Sennosiden, Danthron, Bisacodyl und Natriumpicosulphat keine Veränderungen des VIP-Gehaltes (Abb. 11-13).

Somatostatin: 18 Stunden nach der Einzeldosisbehandlung mit Sennosiden zeigte sich eine signifikante Reduktion des Somatostatingehaltes in der Submukosa des Colon descendens.
In den übrigen Schichten des Colon descendens und in den drei Schichten des Colon ascendens blieb 18 Stunden nach Verabreichung einer hohen Dosis von Sennosiden, Danthron, Bisacodyl und Natriumpicosulphat der Somatostatingehalt unbeinflusst (Abb.11-13).

SP: 18 Stunden nach Einzeldosisbehandlung mit Sennosiden, Danthron, Bisacodyl und Natriumpicosulphat ließ sich keine Veränderung des SP-Gehaltes in der Mukosa, Submukosa und Muskularis externa des Colon ascendens und des Colon descendens nachweisen.
Wegen extrem niedriger Werte des SP-Gehaltes in der Mukosa des Colon ascendens und des Colon descendens wurde auf eine graphische Darstellung dieser Werte verzichtet (Abb. 12-13).

Abb. 11: Gehalt von **VIP** und **Somatostatin** in der **Mukosa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **18 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens

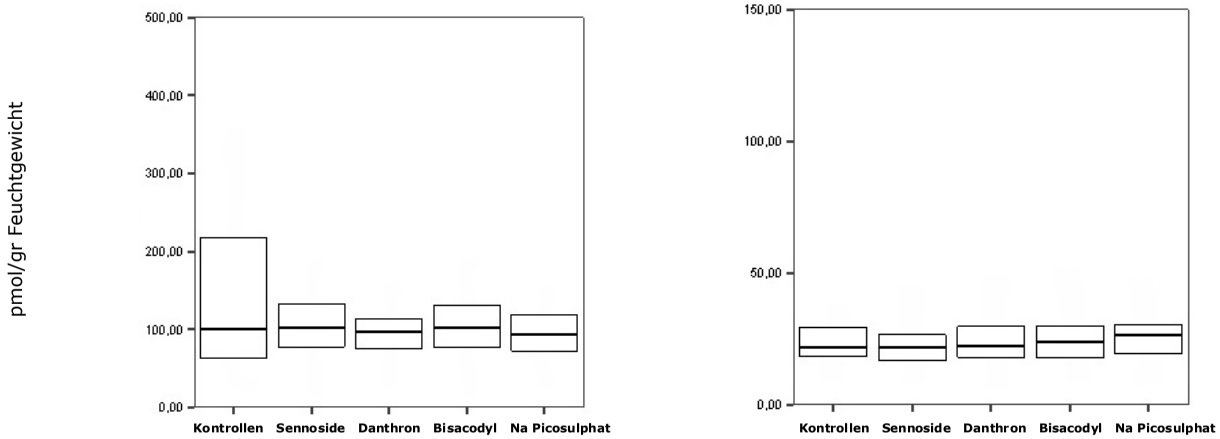
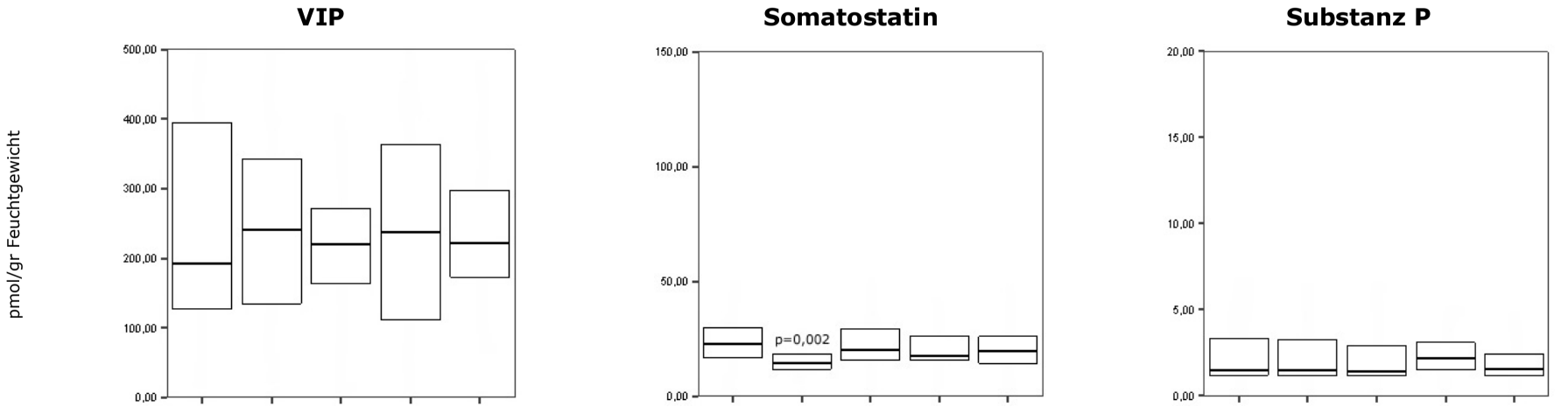


Abb. 12: Gehalt von **VIP**, **Somatostatin** und **Substanz P** in der **Submukosa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **18 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens

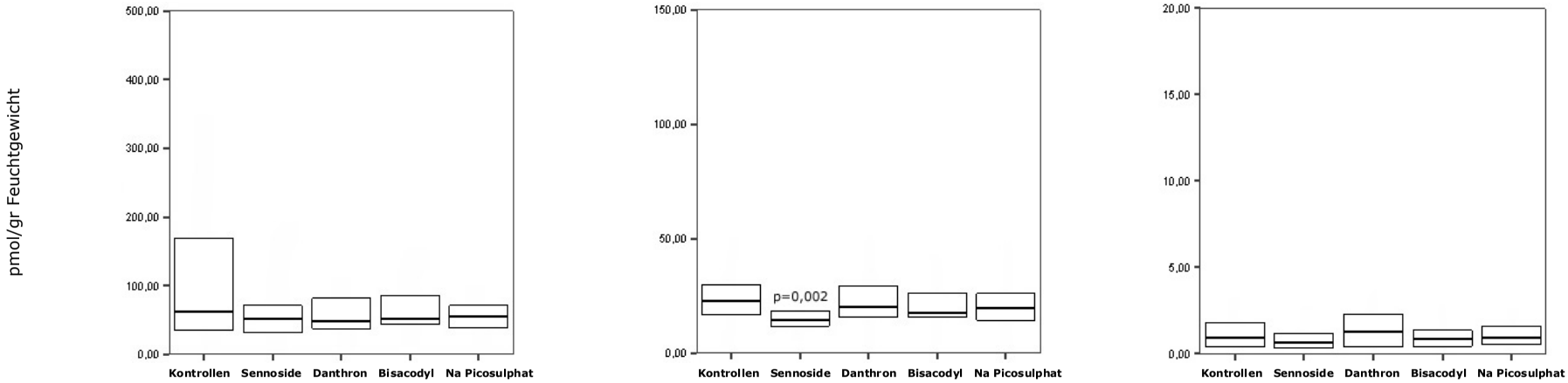
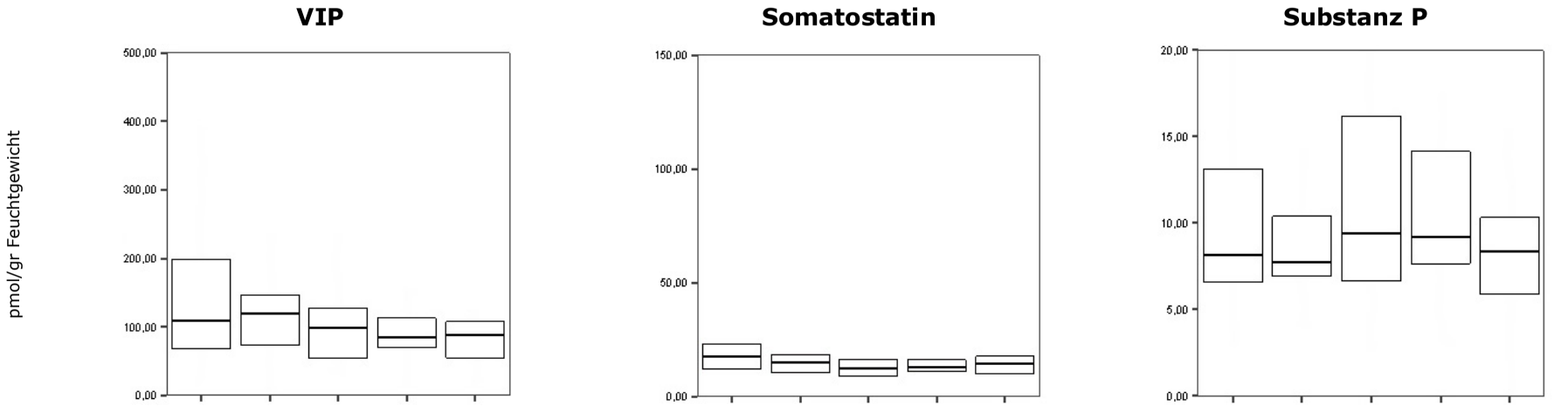
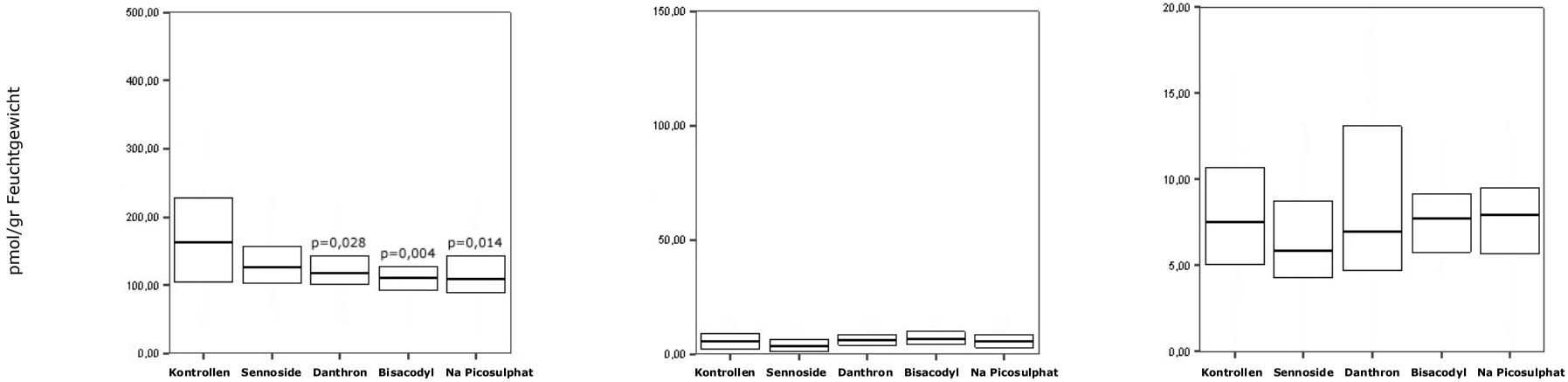


Abb. 13: Gehalt von **VIP**, **Somatostatin**, und **Substanz P** in der **Muskularis externa** des **Colon ascendens** (oben) und **Colon descendens** (unten) **18 Stunden** nach Einzeldosis von Laxantien. Die Darstellungsweise folgt in Boxplots. Die mittlere, horizontale Linie in jeder Box Bezeichnet den Median; die untere Begrenzung jeder Box repräsentiert die 25. Prezentile und die obere Begrenzung die 75. Prezentile.

Colon ascendens



Colon descendens



IV. Diskussion

1. Verteilung der untersuchten Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P bei den Kontrolltieren

Die Innervation des Kolons beinhaltet ein extramurales und ein intramurales Nervensystem. Das extramurale Nervensystem besteht in seinem sympathischen Anteil aus Neuronen, die den Darm über den N. vagus erreichen. Diese Neurone passieren den Grenzstrang, synaptieren in den mesenterialen Ganglien und erreichen das Kolon über perivaskuläre Plexen. Das intramurale Nervensystem besteht aus Neuronen, die in unterschiedlichen Plexen gegliedert sind; der größte dieser Plexen ist der Plexus myentericus Auerbach gefolgt vom Plexus submucosus. Darüber hinaus wurden interstitielle Zellen beschrieben, die sogenannten Cajal-Zellen, die zusammen mit den Neuronen die Motorik der Darmwand regulieren und als Schrittmacher der Darmmuskulatur fungieren (Sanders, 1996; Ward et al., 2004). Die Neurophysiologie des intramuralen Plexus ist noch nicht vollständig bekannt. Es scheint jedoch, klar zu sein, dass der Plexus neben cholinergen exzitatorischen und adrenergen inhibitorischen Neuronen auch andere Neurone enthält, die weder cholinerge, noch adrenerge Transmitter enthalten; als Überträgersubstanzen dieser Nerven kommen Neuropeptide in Frage wie z.B. VIP, Somatostatin und Substanz P.
Man geht davon aus, dass diese Neuropeptide eine wesentliche Rolle in der Regulierung der Kolonmotilität spielen, weshalb sie auch als funktionelle Parameter des enterischen Nervensystems herangezogen werden können. VIP, Somatostatin und Substanz P lassen sich im Plexus myentericus und submucosus des gesamten Gastrointestinaltraktes auffinden. Neurone mit VIP-, Somatostatin- und Substanz P-ähnlicher Immunreaktivität sind an der Innervation der Mukosa, Submukosa und des zirkulären Anteils der Muskularis beteiligt (Fahrenkrug u. Emson, 1982; Ferri et al., 1983 und 1988; Furness et al., 1982; Wattchow et al., 1988; Hens et al., 2001). Substanz P innerviert zusätzlich noch die Längsmuskelschichten des Gastrointesinaltraktes (Wattchow et al., 1988).
Untersuchungen an Meerschweinchen und Menschendarmbiopsien haben gezeigt, dass VIP als nicht-adrenerger, nicht-cholinerger, inhibitorischer Transmitter an der Regulation der Darmperistaltik beteiligt ist (Grider, 1989; Grider u. Makhlouf 1986,

Sandgren et al., 2003). Somatostatin weist ebenfalls einen inhibitorischen Charakter auf (Lucey u. Yamada, 1989). Außerdem wurden hohe Konzentrationen an Rezeptoren für VIP und Somatostatin in der Mukosa des menschlichen Darmes gefunden (Rettenbacher et al., 2001). Substanz P übt vorwiegend eine exzitatorische Funktion aus (Grider, 1989).

Über das normale Verteilungsmuster der Neuropeptide generell und insbesondere der hier untersuchten Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P liegen nur wenige Arbeiten vor (Furness et al., 1982; Ferri et al., 1983 und 1988; Tzavella et al., 1995; Hens et al., 2001). Es konnten jedoch Analogien der Werte unserer Kontrolltiere mit den immunhistochemischen und radioimmunologischen Bestimmungen sowohl von Menschen-, als auch von Tierdarmbiopsien in Bezug auf die relative Verteilung der hier gemessenen Neuropeptide in den Darmschichten erkannt werden.
So zeigte sich in unseren Kontrollgruppen ein hoher VIP-Gehalt in der Mukosa und Submukosa des Colon ascendens und niedrigere Konzentrationen in der Mukosa und Submukosa des Colon descendens und in der Muskularis externa beider Colonabschnitte. Ähnlich verhielt es sich mit dem Gehalt von Somatostatin. Höhere Konzentrationen fanden sich in der Mukosa und Submukosa des Colon ascendens gefolgt von den Konzentrationen in der Mukosa und Submukosa des Colon descendens und schließlich von denen in der Muskularis externa beider Kolonabschnitte.
Substanz P war in der Mukosa des Colon ascendens und Colon descendens in nur geringen Mengen nachweisbar mit einem deutlichen Anstieg hin zur Muskularis externa.

Die Richtigkeit unserer Methode zur Dissektion der Darmwand in Mukosa, Submukosa und Muskularis externa, die mit der von Ferri et al. (1988) beschriebenen Methode im wesentlichen übereinstimmt, wurde durch lichtmikroskopische Kontrollen bestätigt.

2. Akuteffekt der Laxantienbehandlung

Die Problematik der Auswirkungen sowohl der akuten, als auch der chronischen Behandlung mit Laxantien auf den Dickdarm erfreut sich nach wie vor großen Interesses sowohl bei der Ärzteschaft, als auch bei den Patienten. Ein Blick in der aktuellen Fachliteratur bestätigt dies.
Über eine mögliche Schädigung des enterischen Nervensystems des Kolons durch Behandlung mit Laxantien liegen wiedersprüchlige Ergebnisse vor.

Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen kontroverse Ergebnisse. Nach einer vier- bis sechsmonatiger Behandlung mit Sennosiden bei Mäusen bzw. Ratten im Vergleich zu den Kontrollgruppen fanden sich keine ultrastrukturell fassbaren Veränderungen (Dufour u. Gendre, 1984; Rudolph u. Mengs, 1988). Auch durch immunhistochemische oder histologische Methoden im Mäusekolon war kein Effekt auf das enterische Nervensystem nach Behandlung mit Laxantien (Sennosiden) zu sehen (Milner et al., 1992). Kiernan und Heinicke (1989) berichteten über eine unklare Zunahme myenterischer Neurone im Rattenkolon nach viermonatiger Behandlung mit Sennosiden.
Im Gegensatz dazu fanden sich nach oraler und intravenöser Behandlung mit Senna-Sirup in der Studie von Smith (1968) axonale Schäden am Plexus myenterikus des Mäusekolons durch Silberfixation. Da die Zusammensetzung und die Dosis des verabreichten Senna-Sirups, sowie die Behandlungsdauer nicht genau bekannt sind, kann man vermuten, dass die hier beschriebenen Schäden auf das enterische Nervensystem auf freie Antrachinone oder andere Zerfallsprodukte zurückzuführen sind, welche nach intravenöser Verabreichung bei Mäusen eine toxische Wirkung nach sich ziehen können (Dufour u. Gendre, 1984).

Nicht nur tierexperimentelle Untersuchungen weisen auf kontroverse Ergebnisse hin. Retrospektiv morphologische Untersuchungen an Darmbiopsien von Patienten, welche wegen chronischer Obstipation langjährig Laxantien einnahmen, zeigten Veränderungen im Plexus myentericus des Dickdarms. Darunter fiel eine durch Silberfixation erkennbare verminderte Anzahl von Neuronen und Axonen (Krishnamurthy et al., 1985; Smith, 1968 und 1973) auf. Auch im Plexus submucosus wurden ultrastrukturelle Veränderungen, wie zum Beispiel aufgetriebene Axone und eine Reduktion nervenzellspezifischer Zellorganelle, beschrieben (Riemann et al., 1980; Balasz, 1986).
Demgegenüber konnte jedoch durch eine elektronemikroskopische Untersuchung des Darmes chronisch obstipierter Patienten nach einer längerfristigen Einnahme von Anthrachinonen und Füll- oder Quellmittel kein signifikanter Unterschied zwischen beiden behandelten Gruppen aufgewiesen werden (Riecken et al., 1990). Kolonbiopsien der Mukosa ließen nach einjähriger Behandlung geschädigte Neurone in beiden Gruppen feststellen. Lediglich das Verhältnis zwischen geschädigten und intakten Neuronen lag zugunsten der geschädigten in derjenigen Gruppe der Patienten, die mit Anthtachinonen therapiert wurden.
Immunhistohemische Untersuchungen an Darmresektaten von Patienten mit einer chronischen Obstipation zeigten eine signifikante Reduktion von enterischen Ganglienzellen und von intestinalen Cajal-Zellen, die eine wesentliche Rolle in der

Kolonmotilität zu spielen scheinen (Bassotti et al., 2006). Radioimmunologische Untersuchungen an Biopsien aus dem Rectum chronisch obstipierter Patienten zeigten verminderte Gehalte des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P (Tzavella et al., 1996). Untersuchungen der Neurotransmittergehalte bei Patienten mit einer chronischen Obstipation zeigten einen verminderten Gehalt von VIP in der Muskularis externa des Colon descendens (Koch et al., 1988); außerdem reduzierte VIP-Gehalte im Sigmoid nach Entfernung der Mukosa (Milner et al., 1990). Dies unterstreicht die Problematik, ob Veränderungen im enterischen Nervensystem chronisch obstipierter Patienten die Ursache der Erkrankung oder die Folge toxischer Wirkung infolge Einnahme bestimmter Laxantien sind.

In der Studie von Tzavella et al. (1995) fand sich nach einer sechsmonatigen Behandlung mit Laxantien eine signifikante Verminderung des Gehaltes der beiden inhibitorischen Neurotransmitter VIP und Somatostatin; 48 Stunden nach der Einzeldosisapplikation der Laxantien konnte kein Einfluss auf den Gehalt der Neuropeptide beobachtet werden.

Gegenstand unserer prospektiv randomisierten Studie war es den Akuteffekt von Anthrachinonen und diphenolischen Laxantien auf den Gehalt der Neurotransmitter (VIP, Somatostatin und Substanz P) im Rattenkolon 2, 6 und 18 Stunden nach einer einmaligen Applikation einer hohen Laxantiendosis zu untersuchen.

Zwei Stunden nach einer einmalig hochdosierten Gabe von Anthrachinonen und diphenolischen Laxantien zeigte sich keine signifikante Veränderung des Gehaltes der Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P in der Mukosa, Submukosa und Muskularis externa des Colon ascendens und Colon descendens.
Erste Auswirkungen ließen sich interessanterweise erst 6 Stunden nach einer einmalig hochdosierten Gabe von diphenolischen Laxantien nachweisen. So erhöhte sich der Gehalt des inhibitorischen Neurotransmitters Somatostatin in der Mukosa des Colon ascendens und in der Muskularis externa des Colon ascendens und Colon descendens nach einer einmaligen hochdosierten Applikation von Bisacodyl und Natriumpicosulphat. Außerdem beobachteten wir eine signifikante Erhöhung des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P in der Submukosa des Colon ascendens nach der einmaligen Gabe von Natriumpicosulphat. Die einmalig hochdosierte Gabe von Anthrachinonen führte 6 Stunden nach der Applikation zu keiner signifikanten Änderung des Gehaltes der Neuropeptide VIP, Somatostatin und Substanz P.
Achtzehn Stunden nach Verabreichung beider diphenolischen Laxantien zeigte sich eine signifikante Reduktion des inhibitorischen Neurotransmitters VIP in der Muskularis

externa des Colon descendens. Der Gehalt der Neurotransmitter Somatostatin und Substanz P blieb in beiden Colosegmenten unbeeinflußt.

Die einmalig hochdosierte Gabe von Sennosiden führte zu einer signifikanten Redukion des Gehaltes von Somatostatin in der Submukosa des Colon descendens. Die Verabreichung von Danthron führte zu einer signifikanten Reduktion des Gehaltes von VIP in der Muskulris externa des Colon descendens. Die Anthrachinone hatten keinen Einfluss auf den Gehalt von Substanz P.

Zwischen den beiden Gruppen der untersuchten Laxantien (Anthrachinone und diphenolische Laxantien) lassen sich Unterschiede bezüglich ihres Effektes auf den Gehalt der Neurotransmitter feststellen.

Im Gegensatz zu den diphenolische Laxantien zeigen Anthrachinone erst 18 Stunden nach einer hochdosierten Gabe Wirkung auf den Gehalt der inhibitorischen Neuropeptide; Sennoside beeinflussen den Gehalt von Somatostatin im Sinne einer Reduktion in der Submukosa des Colon descendens und Danthron führt zu einer signifikanten Reduktion von VIP in der Muskularis externa des Colon descendens. Bei den diphenolischen Laxantien lassen sich bereits Auswirkungen auf den Gehalt der Neurotransmitter nach 6 Stunden nach der Applikation beobachten. Diese Tatsache unterstützt die Annahme eines unterschiedlichen Wirkmechanismus der beiden Gruppen. Beide Laxantiengruppen wirken antiabsorbtiv, sekretagog und prokinetisch. Über diese Wirkung werden verschiedene Mechanismen postuliert. So führen diese Laxantien zu einer Hemmung der Wasser- und Elektrolytabsorption, und somit zur Erhöhung von Wasser im Darmlumen. Dieser Mechanismus kann über eine Stimulation der lumenwärts gerichteten Chloridsekretion vermittelt werden (Claus et al., 1988; Goerg et al., 1988), der auch prostaglandinvermittelt sein kann (Yagi et al., 1988,1990). Ferner wurden prostaglandinunabhängige Flüssigkeitsbewegungen den Sennosiden zugeschrieben (Mascolo et al., 1988). Es gibt auch Hinweise, dass Sennoside eine histamin- und serotoninvermittelte Wirkung aufweisen (Capasso et al., 1986; Beubler u. Schirgi-Dengen, 1993).

Über die diphenolischen Laxantien wurde zusätzlich eine Hemmung der basolateral gelegenen Na/K ATPase, und somit eine Erhöhung des cAMP diskutiert (Schreiner et al., 1980).

Es wurde postuliert, dass die Beeinflussung der Kolonmotilität durch einen direkten Angriffspunkt an Nervenzellrezeptoren im Falle der Sennoside erfolgt (Hardcastle et al., 1970). Ein prostaglandinvermittelter Mechanismus wurde ebenfalls diskutiert. (Nijs et al., 1993). Dagegen wurde über die diphenolischen Laxantien eine direkte Stimulation der Muskulatur beschrieben (Mitznegg et al., 1975; Materia et al., 1988).

In unserer Studie zeigen sich erste Effekte auf den Gehalt der Neurotransmitter erst nach 6 Stunden nach der Gabe hochdosierter diphenolischen Laxantien, die im Gegensatz zu den Anthrachinonen zu einer signifikanten Erhöhung des inhibitorischen Neurotransmitters Somatostatin und des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P führen. Diese Effekte sind nach 18 Stunden nach der Laxantienapplikation nicht mehr nachweisbar. Interessanterweise beobachten wir 18 Stunden nach der hochdosierten Gabe diphenolischer Laxantien eine signifikante Reduktion des inhibitorischen Neurotransmitters VIP. Die Anthrachinone sind erst nach 18 Stunden involviert; sie führen ebenfalls zu einer Reduktion der inhibitorischen Neurotransmitter VIP und Somatostatin. In unserer Studie wurde das synthetisch hergestellte Anthrachinonderivat Danthron den Ratten verabreicht mit der Zielsetzung, eine so genannte Positivkontrolle zu erhalten, da von einem sicheren negativen Einfluss auf die untersuchten Neuropeptide ausgegangen wurde. Ergebnisse vorausgegangener Untersuchungen zeigten eine toxische Wirkung von Danthron (Mori et al., 1985 und 1986; Siegers et al., 1992), welches im Gegensatz zu den Sennosiden schon im Dünndarm resorbiert wird (Breimer u. Baars 1976; Moreau et al., 1985). Nach einer hochdosierten Gabe von Danthron über einen Zeitraum von vier Monaten konnten elektronenmikroskopisch axonale Veränderungen im Sinne einer Vakuolisation und einer fibrillärer Degeneration gezeigt werden, die für einen schädigenden Effekt dieses Laxans sprechen (Dufour u. Gendre, 1984 und 1988).

Die Studie von Tzavella (1995) zeigte nach 48 Stunden nach einer einmaligen hochdosierten Applikation von diphenolischen Laxantien und Anthrachinonen keinen Effekt auf den Gehalt der Neurotransmitter, auch wenn die Tierzahl deutlich geringer war als in unserer Studie. Dies unterstreicht die Tatsache eines pharmakologischen Effektes der Laxantien als eine Schädigung des enterischen Nervensystems. Dafür spricht auch die kurzfristige Erhöhung von Substanz P sechs Stunden nach der Laxantiengabe, die nach 18 bzw. 48 Stunden und in der Studie von Tzavella et al (1995) in der Langzeittherapie nach der Laxantienapplikation nicht nachweisbar ist.

Die Reduktion der inhibitorischen Neurotransmitter, sowohl 18 Stunden nach der Applikation als auch nach einer Langzeitbehandlung von diphenolischen Laxantien und Anthrachinonen, könnte auf eine verminderte Synthese oder aber einen vermehrten Zerfall dieser Neuropeptide hindeuten. Eine reduzierte Synthese könnte als Schaden am enterischen Nervensystem aufgefasst werden, oder aber als eine Down-Regulation durch pharmakologische Einflüsse der Laxantien. Ein erhöhter Abbau würde am ehesten einem Entleeren der Neuropeptidspeicher durch pharmakologische Einflüsse entsprechen. Die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die inhibitorischen Neurotransmitter VIP und Somatostatin einerseits und den exzitatorischen Neurotransmitter Substanz P andererseits spricht zum einen gegen eine strukturelle

Schädigung des enterischen Nervensystems, zum anderen weist es auf die entgegengesetzte Wirkung dieser Neuropeptide hin. Die Reduktion der Neurotransmitter VIP und Somatostatin, die auf die Kolonmotilität hemmend wirken, und die gleichzeitige fehlende Beeinflussung des Gehaltes des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P führt zu einem relativen Überschuss dieses exzitatorischen Neurotransmitters, was mit einer Erhöhung der Stuhlfrequenz einhergeht.

In dieser Arbeit wurde erstmals in kurz aufeinander folgenden zeitlichen Abständen auf den Akuteffekt von Laxantien auf den Gehalt von Neuropeptiden, als wichtige funktionelle Parameter des enterischen Nervensystems, im Rattenkolon, eingegangen. Es fand sich nach einer Therapie mit diphenolischen Laxantien vorübergehend eine Erhöhung des inhibitorischen Neurotransmitters Somatostatin und des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P. Letztendlich kam es ähnlich wie bei den Anthrachinonen zu einer signifikanten Reduktion des Gehaltes der beiden inhibitorischen Neurotransmitter VIP und Somatostatin und zu einer fehlenden Beeinflussung des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P; dies spricht eher für einen pharmakologischen Effekt, als für einen potentiell toxischen Effekt dieser untersuchten Laxantien.

V. Zusammenfassung

Der akute Effekt einer einmaligen hohen Dosis von Anthrachinonen und diphenolischen Laxantien auf den Gehalt der Neurotransmitter VIP, Somatostatin und Substanz P des enterischen Nervensystems wurde in dieser Studie untersucht. Arbeiten über die potentiellen Auswirkungen von Laxantien auf das enterische Nervensystem nach einer längerfristigen Einnahme ergeben zum Teil kontroverse Aussagen, und Untersuchungen über eine mögliche Kurzzeitwirkung sind eine Rarität.
450 weibliche Wistar-Ratten wurden 15 Gruppen zu je 30 Tieren randomisiert; sie erhielten eine einmalige Gabe entweder des Lösungsmittels (Kontrolltiere) oder einer hohen Dosis von Sennosiden, Danthron, Bisacodyl und Natriumpicosulphat. Zwei bzw. 6, bzw. 18 Stunden nach der Laxantieneinnahme wurde das Kolon den Tieren in Narkose entfernt.
Nachdem die Darmsegmente, Colon ascendens und Colon descendens, entnommen wurden, erfolgte eine Trennung der drei Gewebsschichten Mukosa, Submukosa und Muskularis externa mittels Präparation. Nach Extraktion, Kochen und anschließender Homogenisierung in Essigsäure der jeweiligen Gewebsschichten ließ sich der Gehalt der Neurotransmitter VIP, Somatostatin und Substanz P mittels validierter Radioimmunassays bestimmen.

Zwei Stunden nach der hochdosierten Gabe von Anthrachinonen und diphenolischen Laxantien fand keine Veränderung der Neurotransmittergehalte verglichen mit den Kontrollgruppen statt.
Sechs Stunden nach Gabe von den diphenolischen Laxantien (Bisacodyl und Natriumpicosulphat) ließ sich eine signifikante Erhöhung des inhibitorischen Neurotransmitters Somatostatin in der Mukosa des Colon ascendens und in der Muskularis externa des Colon ascendens und Colon descendens nachweisen. Die einmalige hochdosierte Gabe von Natriumpicosulphat führte zusätzlich zu einer signifikanten Erhöhung des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P in der Submukosa des Colon ascendens. Die Applikation von Anthrachinonen (Sennoside und Danthron) ließ den Gehalt der Neurotransmitter unbeinflusst.
Achtzehn Stunden nach Verabreichung der diphenolischen Laxantien zeigte sich eine signifikante Reduktion von VIP in der Muskularis externa des Colon descendens. Nach

Applikation von Sennosiden kam es zu einer signifikante Reduktion von Somatostatin in der Submukosa des Colon descendens ; die Gabe von Danthron führte zu einer signifikante Reduktion von VIP in der Muskularis externa des Colon descendens. Der Substanz P-Gehalt blieb unbeeinflusst.

Daraus lässt sich folgern, dass eine einmalige hochdosierte Behandlung mit Anthrachinonen und diphenolischen Laxantien vorübergehend den Gehalt des inhibitorischen Neurotransmitters Somatostatin und des exzitatorischen Neuroransmitters Substanz P zu erhöhen, letztendlich jedoch den Gehalt der inhibitorischen Neurotransmitter VIP und Somatostatin zu vermindern vermag.
Dies könnte Ausdruck einer toxischen Wirkung oder aber eines pharmakologischen Einflusses der Laxantien auf das enterische Nervensystem sein. Für letzteres spricht die fehlende Beeinflussbarkeit des exzitatorischen Neurotransmitters Substanz P; die Reduktion der inhibitorischen Neurotransmitter VIP und Somatostatin könnte durch eine verminderte Synthese oder durch einen vermehrten Abbau bedingt sein.
Die kurzfristige Erhöhung der Neurotransmitter Somatostatin und Substanz P 6 Stunden nach Gabe diphenolischer Laxantien im Gegensatz zu den Anthrachinonen könnte Ausdruck eines unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der beiden untersuchten Laxantiengruppen (Anthrachinone und diphenolische Laxantien) sein, die beide als antiabsorptiv, sekretagog und prokinetisch klassifiziert werden.

VI. Literaturverzeichnis

1. Adrian, T.E. (1982): Radioimmunoassay. In: Bloom, S.R., Long, R.G. (edit.): Radioimmunoassay of regulatory peptides. W.B. Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto; Chapter 2: 3-10

2. Balazs, M. (1986): Melanosis coli. Ultrastructural study of 45 patients. Dis Col Rec; 29: 839-844

3. Bass, P., Dennis, S. (1981): The laxative effects of lactulose in normal and constipated subjects. J clin Gastroenterol; 3 (Suppl. 1): 23-8

4. Bassoti, G., Villanacci, V., Maurer, C A., Fisogni, S., Di Fabio, F., Cadei, M., Morelli, A., Panagiotis, T., Cathomas, G., Salerni, B (2006): The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. Gut; 55: 41-46

5. Beubler, E., Schirgi-Degen, A. (1993): Serotonin antagonists inhibit sennoside-induced fluid secretion and diarrhea. Pharmacol; 47 (Suppl.1): 64-9

6. Binder, H., J., Donowitz, M., (1975): Clinical trends and topics: a new look at laxative action. Gastroenterol; 69(4): 1001-5

7. Breimer,D., D., Baars, A.J. (1976): Pharmacokinetics and metabolism of anthraquinone laxatives. Pharmacol, 14 (Suppl. 1): 30-47

8. Bryant, M.G., Bloom, S.R.: Measurment in tissues. In Bloom, S.R., Long, R.G. (edit.): Radioimmunoassay of regulatory peptides. W.B Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto 1982; Chapter 6: 36-41

9. Capasso, F, Mascolo, N., Autore, G., Romano, V. (1986): Laxatives and the production of autacoids by rat colon. J Pharm Pharmacol; 38(8): 627-9

10. Clauss, W., Domokos, G., Leng-Peschlow, E. (1988): Effect of rhein on electrogenic chloride secretion in rabbit distal colon. Pharmacol; 36 (Suppl. 1): 104-10

11. Cummings, J.H. (1974): Laxative abuse. Gut; 15: 758-66

12. Drossman DA, Li Z, Andruzzi E., at al. (1993): U.S. housholder survey of functional gastrointestinal disorders: prevalence, sociodemoraphy and health impact. Dig Dis Sci; 38: 1569-1580

13. Dufour, P., Gendre, P. (1984): Ultrastructure of mouse intestinal mucosa and changes observed after long term anthraquinone administration. Gut; 25: 1355-63

14. Dufour, P., Gendre, P. (1988): Long-term mucosal alterations by sennosides and related compounds. Pharmacol; 36 (Suppl. 1): 194-202

15. Everhardt, JE, Go, VL, Johannes, RS, et al. (1989): A longitudinal survey of self-reported bowel habits in the United States. Dig Dis Sci; 34: 1153

16. Ewe, K., Karbach, U. (1986): Fasctitius duarrhoea. Clin Gastroenterol; 15: 723-39

17. Fahrenkrug, J., Emson, P.C. (1982): Vasoactive intestinal polypeptide: functional aspects. Br Med Bull; 38(3): 265-70

18. Ferri, G.-L., Adrian, T.E., Allen, J.M., Soimero, L., Cancellieri, A., Yeats, J.C., Blank, M., Polak, J.M., Bloom, S.R. (1988): Intramural distribution of regulatory peptides in the sigmoid-recto-anal region of the human gut. Gut; 29: 762-68

19. Ferri, G.-L., Adrian, T.E., Ghatei, M.A., O´Shaughnessy,D.J., Probert, L., Lee, Y.C., Buchan, A.M.J., Polak, J.M., Bloom, S.R. (1983): Tissue localisationand relative distribution of regulatory peptides in separated layers from the human bowel. Gastroenterol; 84(4): 777-86

20. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (2005): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, München, Urban und Fischer; 574-77

21. Furness, J.B., Costa, M., Murphy, R., Beardsley, A.M., Oliver, J.R., Llewellyn-Smith, I.J., Eskay, R.L., Shulkes, A.A., Moody, T.W., Meyer, D.K. (1982): Detection and charakterisation of neurotransmitters, particulary peptides, in the gastrointestinal tract. Scand J Gastroenterol; 17(Suppl. 71): 61-70

22. Geboes, K., Spiessens, C., Nijs, G., de Witte, P. (1993): Anthranoids and the mucosal immune system of the colon. Pharmacol; 47 (Suppl. 1): 49-57

23. Goerg, KJ., Wanitschke, R., Schulz, L. (1980): Scanning electron microscopic study of the effect of rhein on the surface morphology of the rat colonic mucosa. Pharmacol; 20 (Suppl. 1): 36-42

24. Goerg, KJ., Wanitschke, R., Schwarz, M., Meyer, zum Büschenfelde, K.H. (1988): Rhein stimulates active chloride secretion in the short-circuited rat colonic mucosa. Pharmacol; 36 (Suppl. 1): 111-9

25. Grider, J.R. (1989): Identification of neurotransmitters regulating intestinal peristaltic reflex in humans. Gastroenterol; 97(6): 1414-19

26. Grider, J.R., Makhlouf, G.M. (1986): Colonoc peristaltic reflex: identification of vasoactive intestinal peptide as mediator of descending relaxation. Am J Physiol; 251: G40-5

27. Hardcastle, J.D., Wilkins, J.L. (1970): The action of sennosides and related compounds on human colon and rectum. Gut; 11: 1038-42

28. Hattori, M., Namba, T., Akao, T., Kobashi, K. (1988): Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. Pharmacol; 36(Suppl. 1): 172-9

29. Heinicke, E.A., Kiernan, J.A. (1990): Resistance of myenteric neurons in the rat´s colon to depletion by 1,8- dihydroxyanthraquinone. J Pharmacol; 42: 123-25

30. Hens J., et al. (2001): Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. J Neurochemistry; 76: 464-471

31. Holtermüller, K.H (2002): Arzneiverordungsreport 2002, Springer Verlag; 550-555

32. Jauch, R., Hammer, R., Busch, U., Kopitar, Z., Ohnuma, N., Niki, T. (1977): Pharmakokinetik und Metabilismus von Na-Picosulfat bei der Ratte. Arzeim Forsch, 27: 1045-50

33. Jauch, R., Hankwitz, R., Beschke, K., Pelzer, H. (1975): Bis(p-hydroxyphenyl)-pyridyl-2methane: the common laxative principle of bisacodyl and sodium picosulfate. Arzneim Forsch; 25: 1796-800

34. Karaus, M., Sarna, S.K., Ammon, H.V., Wienbeck,M. (1987): Effects of oral laxatives on colonic motor complexes in dogs. Gut; 28: 1112-9

35. Khalif, IL., Quigley EM., Konovitch EA., Maximova ID (2005): Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. Dig Liver Dis; 37(11): 838-49

36. Kiernan, J.A., Heinicke, E.A. (1989): Sennosides do not kill myenteric neurons in the colon of the rat or mouse. Neuroscience; 30(3): 837-42

37. Klauser, A. G., Heinrich, C.A.., Müller-Lissner, S.A.: Chronische Obstipation: Ein Problem in der Praxis. In: Müller-Lissner, S.A., Akkermans, L.M.A. (Hrsg.): Chronische Obstipation und Stuhlinkontinenz. Springer Verlag; Berlin, heidelberg, New York, Paris, Tokyo, Hong Kong 1989; 1: 1-6

38. Knopf, H., Melchert, H.U. : Bundes-Gesundheitssurvey: Arnzeimittelgebrauch, Konsumverhalten in Deutschland. Robert Koch-Institut, Berlin 2003

39. Koch, T.R., Carney, J.A., Go, L., Go, V.L.W. (1988): Idiopathic chronic constipation is associated with decreased colonic vasoactive intestinal peptide. Gastroenterol; 94(2): 300-310

40. Krishnamurthy, S., Schuffler, M.D., Rohrmann, C.A. Pope, C.E. (1985): Severe idiopathic constipation is associated with a distinctive abnormality of the colonic myenteric plexus. Gastroenterol; 88(1): 26-34

41. Kuschinsky, K., Oberdisse, E., Hackenthal, E. (2002): Pharmakologie und Toxikologie, 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 590-2

42. Lang, W. (1988): Pharmacokinetics of 14C-labelled rhein in rats. Pharmacol; 36(Suppl. 1): 158-71

43. Lemmli, M. (1988): Metabolism of sennosids- an overview. Pharmacol; 36 (Suppl. 1): 126-8

44. Lemmli, J., Lemmens, L. (1980): Metabolism of sennosides and rhein in the rat. Pharmacol; 20 (Suppl. 1): 50-7

45. Leng-Peschlow, E. (1992): Senna and its rational use. Pharmacol; 44 (Suppl. 1): 1-52

46. Leng-Peschlow, E., Odenthal, K.P., Vorderholzer, W., Müller-Lissner, S. (1993): Chronic Sennoside Treatment Does Not Cause Habituation and Secondary Hyperaldosteronism in Rats. Pharmacol; 47(Suppl. 1): 162-71

47. Long, R.G., Bloom, S.R. (1982): Intoduction in Bloom, S.R., Long, R.G., (Hrsg): Radioimmunoassay of gut regulatory peptides. W.B. Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto; Chapter 16: 1-2

48. Lucey, M.R., Yamada, T. (1989): Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. Dig Dis Sci; 34(3): 5S-13S

49. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (2003): Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag; 232-35

50. Materia, E., Corazziari, E., Bausano, G., Anzini, F.A., Torsoli, A. (1988): Effect of bisacodyl on motor activity of sigmoid colon. Ital J Gastroenterol; 20: 246-49

51. Mascolo, N., Meli, R., Autore, G., Capasso, F. (1988): Evidence against a dependence of the senna effect on prostaglandin formation. Pharmacol; 36 (Suppl. 1): 92-97

52. Mascolo, N., Mereto, E., Borelli, F., et al. (1999): Does Senna extract promote growth of aberrant crypt foci and malignant tumors in rat colon? Dig Dis Sci;44: 2226-30

53. Mengs, U., Rudolph, R.L. (1993): Light and electron-microscopic changes in the colon of the guinea pig after treatment with anthranoid and non-anthranoid laxatives. Pharmacol; 47 (Suppl. 1): 172-7

54. Milner, P., Belai, A., Tomlinson, A., Hoyle, C.H.V., Sarner, S., Burnstock, G. (1992): Effects of long term laxative treatment on neuropeptides in rat messenteric vessels and ceacum. L Pharm Pharmacol; 44: 777-79

55. Milner, P., Crowe, R., Kamm, M., Lennard-Jones, J.E., Burnstock, G. (1990): Vasoactive intestinal polypeptide levels in sigmoid colon in idiopathic constipation and diveticular disease. Gastroenterol; 99(3): 666-75

56. Mitznegg, P., Schubert, E., Domschke, W., Strunz, U., Domschke, S., Schwemmle, K., Demmling, L., Heim, F. (1975): Wirkungsweise des Bisacodyl (Dulcolax) an der isolirten Dickdarmmuskulatur des Menschen. Klein Wschr; 53: 493-95

57. Moreau, J.P., Moreau, S., Skinner, S. (1985): Comparative physiological disposition of some antraquinone glycosides and aglycones. Biopharm Drug Dispos; 6: 325-334

58. Moreto, M., Planas, J.M., Naftalin, R.J. (1981): Effects of secretagogues on the K Pemeability of the mucosal and serosal borders of rabbit colonic mucosa. Acta biochim and biophys; 648: 215-24

59. Mori, H., Sugie, S., Niwa, K., Takahashi, M., Kawai, K. (1985): Induction of intestinal tumours in rats by chrysazin. Br J Cancer; 52: 781-83

60. Mori, H., Sugie, S., Niwa, K., Yoshimi, N., Tanaka, T., Hirono, I. (1986): Carcinogenity of chrysazin in large intestine and liver in mice. Jpn J Cancer Res; 77: 871-6

61. Mori, H., Yoshimi, N., Iwata, H., et al. (1990): Carcinogenity of naturally occurring 1-hydroxyanthraquinone in rats: induction of large bowel, liver and stomach neoplasms. Carcinogenesis; 11: 799-802

62. Müller-Lissner, S. (1992): Nebenwirkungen von Laxantien. Z Gastroenterol; 30: 418-27

63. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer- Korting, M. (2001): Arzneimittelwirkungen; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Wiss. Verl. Ges., 2001; 647-652

64. Nijs, G., deWitte, P., Geboes, K., Meuleman, A., Schuurkes, J., Lemli, J. (1993): In vitro demonstration of a positive effect of rhein anthrone on peristaltic reflex of guinea pig ileum. Pharmacol; 47 (Suppl. 1): 40-48

65. O`Shaugnessy, D.J. (1982): Somatostatin. In: Bloom, S.R.; Long, R.G. (Hrsg.): Radioimmunoassay of gut regulatory peptides. W.B. Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto; Chapter 18: 138-145

66. Pochros, PJ., Foroozan, P. (1985): Golytely lavage versus a standard colonoscopy preparation. Effect on normal colonic mucosal histology. Gastroenterol; 88(2): 545-8

67. Read, N.W., Krejs, G.J., Read, M.G., Santa Ana, C.A., Morawski, S.G., Fordtran, J.S. (1980): Chronic diarrhea of unknown origin. Gastroenterol; 78(2): 264-71

68. Rettenbacher, M., Reubi, JC. (2001): Localisation and characterisation of neuropeptide receptors in human colon. Naunyn Schmiedebergers Arch Pharmacol; 364(4): 291-304

69. Riecken, E.O., Zeitz, M., Emde, C., Hopert, R., Witzel, L., Hintze, R., Marsch-Ziegler, U., Vester, J.C. (1990): The effect of anthraquinone laxatives on colonoc nerve tissue: a controlled trial in constipated woman. Z Gastroenterol; 28: 660-64

70. Riemann, J.F., Schmidt, H., Zimmermann, W. (1980): The fine structure of colonic submucosal nerves in patients with chronic laxative abuse. Scand J Gastroenterol; 15:761-68

71. Riemann, J.F., Schenk, R., Ehler, R., Schmidt, H., Koch, H. (1978): Ultrastructural Changes of Colonic Mucosa in Patients with Chronic Laxative Misuse. Acta Hepato.Gastroenterol; 25: 213-18

72. Rudolph, R.L., Mengs, U. (1988): Electron microscopical studies on rat itestine after long-term treatment with sennosides. Pharmacol; 36 (Suppl. 1): 188-93

73. Russel, N.J., Royland, J.E., McCawley, E.L. (1980): Danthron induced melanosis coli in the guinea pig. Proc West Pharmacol Soc; 23: 277-80

74. Sanders, SM (1996): A case of interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. Gastroenterol; 111: 492-515

75. Sandgren K., Zhong Lin, Ekblad E. (2003): Differential effects of VIP and PACAP on survival of cultured adult rat myenteric neurons. Reg Pep; 111: 211-17

76. Schreiner, J., Nell, G., Loeschke, K. (1980): Effect of Diphenolic Laxatives on Na+-K+-Activated ATPase and Cyclic Nukleotide Content of Rat Colon Mukosa in vivo. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol; 313: 249-55

77. Siegers, C.P. (1992): Athranoid laxatives and colorectal cancer. Trends Pharmacol Sci; 13: 229-231

78. Siesers C.-P., Siemers, J., Baretton, G. (1993): Sennosides and Aloin do not promote Dimethylhydrazine-induced Colorectal tumors in mice. Pharmacol; 47(Suppl. 1): 205-208

79. Sjolund K., Fasth, S., Ekman, R., Hulten, L., Jiborn, H., Nordgren S., Sundler, F. (1997): Neuropeptides in idiopathic chronic constipation (slow tsansit constipation). Neurogastroenterol Motil; 9(3): 143-50

80. Sleisenger, M.H., Fordtran, J.S. (1978): Gastrintestinal disease: pathophysiology, diagnosis, management. Philadelphia; Saunders, W.B.: 1860-2

81. Smith, B. (1968): Effect of irritant purgatives on the myenteric plexus in man and the mouse. Gut; 9: 139-43

82. Smith, B. (1973): Pathologic Changes in the Colon Produced by Anthraquinone Purgatives. Dis Col Rec 1973; 1b: 455-9

83. Sonneberg, A., Sonneberg, G.S. (1989): Epidemiologie der Obstipation. In: Müller-Lissner, S.A., Akkermans, L.M.A. (Hrsg.): chronische Obstipation und Stuhlinkontinenz. Springer Verlag; berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong 1989; 12: 141-156

84. Spear, G. S. (1951): Melanosis coli: Experimental observations on ist production and elimination in twenty-three cases. Am J Surg; 82: 631-37

85. Spiessens, C., De Witte, D., Geboes, K., Lemmli, J. (1991): Experimental induction of pseudomelanosis coli by anthranoid laxatives and non-anthranoid laxatives. Pharmaceut Pharmacol lett; 1: 3-6

86. Sund, R.B, Songedal, K., Harestad, T., Salvesen, B., Kristiansen, S. (1981): Enterohepatic circulation, urinary excretion and laxative action of some bisacodyl derivates after intragystric administration in the rat. Acta pharmacol toxicol; 48: 73-80

87. Talley, N.J., Phillips, S.F., Haddad, A., et al. (1990): GR 38032F (ondasteron), a selective 5HT receptor antagonist, slows colonic transit in healthy man. Dig Dis Sci; 35: 477-8

88. Tedesco, F.J., DiPiro, J.T. (1985): Laxative use in constipation. Am J Gastroenterol; 80(4): 303-9

89. Thompson, WG, Longstreth, GF, Drossman, DA, et al. (1999): Functional bowel disorders and functional abdominal pain. Gut; 45 Suppl 2: II43

90. Tzavella, K., Riepl, R.L., Vorderholzer, W.A., Klauser, A.G., Schindlbeck, N.E., Müller-Lissner, S.A. (1996): Decreased substance P levels in rectal biopsies from patients with slow transit constipation. Eur J Gastroenterol Hepatol; 8(12): 1207-11

91. Tzavella, K., Schenkirsch, G., Riepl, R., Odenthal, K.P., Leng.Peschlow, E., Müller-Lissner, S. (1995): Effects of long-term treatment with anthranoids and sodium picosulphate on the contents of vasoactive intestinal polypeptide, somatostatin and substance P in the rat colon. Eur J Gastroenterol Hepatol; 7: 13-20

92. Van Gorkom, B.A.P., Karrenbeld, A., Limburg, A.J., Kleibeuker, J.H. (1998): The effect of senosides on colonic mucosal histology and bowel preparation. Z Gastroenterol; 36: 13-18

93. Van Gorkom, B.A.P., Karrenbeld, A., van de Slius, T., Koudstaal, J., de Vries, E.G.E., Kleibeuker, J.H. (2000): Influence of a Highly Purified Senna Extract on Colonic Epithelium. Digestion; 61: 113-20

94. Van Gorkom, B.A.P., Karrenbeld, A., van de Slius, T., Zwart, N., de Vries, E.G., Kleibeuker, J.H. (2001): Apoptosis induction by sennoside laxatives in man; escape from protective mechanism during chronic sennoside use? J Pathol; 194(4): 493-9

95. Velio, P., Bassoti, G. (1996): Chronic Idiopathic Constipation: Pathophysiology and Treatment. J Clin Gastroenterol; 22(3): 190-96

96. Venturini, S., Tamaro, M. (1979): Mutagenicity of anthraquinones in Ames' Salmonella typhimurium test. Mutat Res; 68: 307-12

97. Vorderholzer W.A., Wiebecke, B., Gerum M., Müller-Lissner, S.A (2000): Dysplasia of the submucous nerve plexus in slow transit constipation of adults. Eur J Gastroenterol Hepatol; 12: 755-59

98. Walker, N.I., Bennet, R., Axelsen, R.A. (1988): Melanosis Coli: a consequence of anthraquinone induced apoptosis of colonic epithelial cells. Am J Pathol; 131(3): 465-76

99. Ward, SM, Sanders, KM, Hirst, GD (2004): Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. Neurogastroenterol Motil; 16 (Suppl. 1): 112-17

100. Wattchow, D.A., Furness, J.B., Costa, M. (1988): Distribution and Coexistence of Peptides in Nerve Fibers of the External Muscle of the Human Gastrointestinal Tract. Gastroenterol; 95: 32-41

101. William, M. (1989): The extra pharmacopoeia of Martindale. Reynolds, J.E., ed. London: Pharmacoeutical Press; 1073-112, 1057-58

102. Wittoesch, JH, Jackman, RJ, Mc Donald, JR (1958): Melanosis coli: general review and a study of 887 cases. Dis Colon Rectum; 13: 172-80

103. Yagi, T., Miyawaki, Y., Nishikawa, A., Horiyama, S., Yamauchi, K., Kuwano, S. (1990): Prostaglandin E2-mediated stimulation of mucus synthesis and secretion by rhein anthrone, the active metabolite of sennosides A and B, in the mouse colon. J Pharm Pharmacol; 42(8): 542-5

104. Yagi, T., Miyawaki, Y., Nishikawa, A., Yamauchi, K., Kuwano, S. (1988): Involvement of prostaglandin E-like material in the purgative action of rhein anthrone, the intraluminal active metabolite of sennosides A and B in mice. J Pharm Pharmacol; 40(1): 27-30

105. Yamauchi, K., Yagi, T., Kuwano, S. (1993): Supression of the Purgative Action of Rhein Anthrone, the Active Metabolite of Sennosides A and B, by Calcium Channel Blockers, Calmodulin Antagonists and Indometacin. Pharmacol; 47(Suppl. 1): 22-31

VII. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdaten: 30.08.1976 in Ludwigshafen a. Rhein

Eltern: Georgios Malamoussis

und Athanassia Malamoussi, geb. Zacharaki

Staatsangehörigkeit: deutsch / griechisch

Schulbildung

- 1982-1988 Private Volksschule der Republik Griechenland in München
- 1988-1991 Privates Gymnasium der Republik Griechenland in München
- 1991-1994 Privates Lyzeum der Republik Griechenland in München
- 1994 Griechisches Fachabitur in München

Studium

- 1995-2002 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
  - Aug. 1997 Ärztliche Vorprüfung
  - März 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
  - Aug. 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
  - Nov. 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

- Okt. 2003-Sept. 2004 Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik I im Marienhaus Klinikum St. Elisabeth Neuwied
- Seit Okt. 2004 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I im Marienhaus Klinikum St. Elisabeth Neuwied