

# Elektrophysiologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener Neurotransmitter im myenterischen Plexus des Meerschweinchenmagens

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat  
genehmigte Dissertation  
von  
Dipl.-Phys. Klaus Michel  
geboren am 8.6.1964 in Gießen

Referent: Prof. Dr. M. Schemann  
Korreferent: Prof. Dr. St. Steinlechner  
Tag der Promotion: 3. November 1998

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die elektrophysiologischen, neuropharmakologischen und neurochemische Eigenschaften funktionell identifizierter enterischer Neurone im Magen des Meerschweinchens *in vitro* zu charakterisieren. Durch intrazelluläre Ableitungen wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone sowie prä- und postsynaptische Wirkungen von Serotonin, Noradrenalin, Stickoxid und Glycin ermittelt. Diese Ergebnisse wurden mit dem neurochemischen Code (Transmitter-Kolokalisationen), der Projektionsrichtung und dem Innervationsgebiet der Axone korreliert, welches eine Klassifizierung der Nervenzellen als Motorneurone und Interneurone ermöglichte. Insgesamt wurden 454 Nervenzellen untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Projektionsrichtung der Axone mit dem neurochemischen Code der Neurone korrelierte. 83 % der cholinergen Neurone mit den Transmitterkombinationen ChAT/–, ChAT/SP oder ChAT/NPY waren primär ascendierend während 66 % der Neurone der nitroxidergen Populationen NOS/– und NOS/NPY primär deszendierende Projektionen aufwiesen. Da cholinerge Neurone als erregende, nitroxiderge Neurone jedoch als hemmende Neurone klassifiziert wurden, könnte dieses polarisierte Projektionsmuster die neuronale Basis der peristaltischen Wellen im Magen darstellen. Interneurone waren primär cholinerg (83 %) während Motorneurone etwa zu gleichen Teilen cholinerg (62 %) oder nitroxiderg (38 %) waren. Dies stimmte mit den elektrophysiologischen Befunden überein, da zum einen alle Nervenzellen cholinerg vermittelte fEPSP's (erregende postsynaptische Potentiale) zeigten, Stickoxid jedoch keine postsynaptischen Wirkungen hatte und nur in 10 % der untersuchten Neurone präsynaptisch die fEPSP's hemmte. Diese Befunden lassen darauf schließen, daß die motilitätshemmende Wirkung von Stickoxid auf einer direkten Wirkung auf die Muskulatur beruht. Bei 77 % der Neurone führte Serotonin zu einer rezeptorspezifischen, postsynaptischen Aktivierung. Eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte Wirkung wurde vorwiegend auf cholinergen, ascendierenden Neuronen gefunden, während eine 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort vorwiegend in nitroxidergen, deszendierenden Neuronen ausgelöst wurde. Motilitätsstudien an Magenwandpräparaten unterstützten diese Befunde, indem ein 5-HT<sub>3</sub>- Agonist kontraktile und ein 5-HT<sub>1P</sub>-Agonist relaxierend wirkte. Durch die spezifische Aktivierung von Neuronenpopulationen mit verschiedenen Projektionsrichtungen und neurochemischen Codes könnte Serotonin die peristaltische Welle und damit die Magenentleerung modulieren. Noradrenalin wirkte bei 15 % der Neurone durch  $\alpha_1$ -Rezeptoren erregend und hatte bei 37 % der Neurone eine hemmende Wirkung, die durch präsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermittelt wurde. Eine postsynaptische, hemmende Antwort wurde bei 10 % der Neurone beobachtet. Die präsynaptische Hemmung trat vorwiegend bei cholinergen Motorneuronen auf. Dies könnte bedeuten, daß die motilitätshemmende Wirkung von Noradrenalin vorwiegend durch die Hemmung erregender Muskelmotorneurone zustande kommt. Glycin zeigte bei 26 % der Neurone eine Strychnin-sensitive depolarisierende Wirkung, die auf einem Austrom von Chloridionen beruhte. Diese Studie zeigte Zusammenhänge zwischen elektrophysiologischen, neuropharmakologischen und neurochemischen Eigenschaften von Motor- und Interneuronen im enterischen Nervensystem. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge ist die Basis für ein besseres Verständnis der Regulation von Motorik und Sekretion im Magen durch das enterische Nervensystem.

**Schlagworte:** Enterisches Nervensystem, Neurotransmitter, Elektrophysiologie

## Summary

The aim of this study was the electrophysiological, neuropharmacological and neurochemical *in vitro* characterisation of functionally identified enteric neurones of the guinea pig stomach. The electrophysiological features as well as pre- and postsynaptic actions of serotonin, norepinephrine, nitric-oxide (NO) and glycine were determined by intracellular recording techniques. These data were correlated with the immunohistochemical demonstration of the neurochemical coding of the neurones and their projections and the target tissue of their axons. A total of 454 neurones were examined.

Results indicated that the axonal projection correlated with the neurochemical coding of the neurones. Thus, 83 % of the cholinergic neurones with the transmitter code ChAT/–, ChAT/SP or ChAT/NPY were mainly ascending, while 66 % of the nitrenergic populations NOS/– and NOS/NPY had preferentially descending projections. Cholinergic neurones could be identified as excitatory, nitrenergic neurones as inhibitory neurones. Therefore this polarised projection pattern could be the basis of the peristaltic waves in the stomach. Interneurones were mainly cholinergic (83%), while roughly equal numbers of motoneurones were either cholinergic (62 %) or nitrenergic (38 %). This correlated with the electrophysiological findings: All neurones received cholinergic fEPSP's which were abolished by NO only in 10 % of the neurones. No postsynaptic actions of NO could be found. Therefore, it has to be concluded that the relaxing action of NO is achieved by its direct effect on the musculature.

Receptor-specific, postsynaptic excitatory actions of serotonin were found in 77 % of the neurones. A 5-HT<sub>3</sub>-mediated action was found mainly in cholinergic ascending neurones, whereas a 5-HT<sub>1P</sub>-response was primarily evoked in nitrenergic, descending neurones. These findings were confirmed by *in vitro* motility-studies where a 5-HT<sub>3</sub>-agonist increased whereas a 5-HT<sub>1P</sub>-agonist decreased basal and nerve evoked motor responses. By its specific activation of neuronal populations with different projections and neurochemical coding, serotonin could modulate peristaltic waves and thereby gastric emptying rate.

Norepinephrine activated 15 % of the neurones via  $\alpha_1$ -receptors and inhibited cholinergic fEPSP's in 37 % of the neurones through presynaptic  $\alpha_2$ -receptors. A postsynaptic, inhibitory action was observed in 10 % of the neurones. The presynaptic action was found primarily in cholinergic motoneurones. This could mean that the relaxing effect of norepinephrine is mainly achieved by the inhibition of the acetylcholine release at excitatory motoneurones.

Glycine showed in 26 % of the neurones a strychnine-sensitive depolarisation, which could be attributed to an efflux of chloride ions.

This study showed correlations in the electrophysiological, neuropharmacological and neurochemical features of motor- and interneurones in the enteric nervous system. The knowledge of these correlations is the basis for a better understanding of the regulation of gastric motoric and secretoric behaviour by the enteric nervous system.

**Key words:** Enteric nervous system, Neurotransmitter, Electrophysiology

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>i</b>
<b>Summary</b>	<b>ii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1 Präparation . . . . .	8
2.2 Elektrophysiologie . . . . .	11
2.3 Immunhistochemie . . . . .	14
2.4 <i>In Vitro</i> -Motilitätsuntersuchungen . . . . .	17
2.5 Auswertung . . . . .	18
2.6 Statistik . . . . .	20
2.7 Lösungen . . . . .	21
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1 Elektrophysiologie . . . . .	23
3.2 Neurochemischer Code . . . . .	25
3.2.1 Erregbarkeit und neurochemischer Code . . . . .	26
3.3 Projektion der Axone . . . . .	29
3.3.1 Erregbarkeit, neurochemischer Code und Projektion der Neurone . . . . .	30
3.4 Funktion der Neurone . . . . .	30

3.4.1	Funktion, Erregbarkeit, neurochemischer Code und Projektion der Neurone . . . . .	31
3.5	Pharmakologie . . . . .	33
3.5.1	Serotonin . . . . .	33
3.5.2	Noradrenalin . . . . .	45
3.5.3	Stickoxid . . . . .	50
3.5.4	Glycin . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1	Elektrophysiologie, neurochemischer Code, Funktion und Projektion . . . . .	56
4.2	Serotonin . . . . .	62
4.3	Noradrenalin . . . . .	65
4.4	Stickoxid . . . . .	68
4.5	Glycin . . . . .	69
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
	<b>Wissenschaftlicher Werdegang</b>	<b>84</b>

# Tabellenverzeichnis

2.1	Mit den durchgeführten Färbungen identifizierbare neurochemische Codes . . . . .	15
2.2	Fluoreszenzfilter . . . . .	18
3.1	Membranpotentiale von Gastric-I,-II und -III Neuronen . . . . .	23
3.2	Neuronale Marker in den gefärbten Neuronen . . . . .	25
3.3	Kolokalisationen von neuronalen Markern in ChAT $\oplus$ und NOS $\oplus$ Neuronen . . . . .	26
3.4	Elektrische Erregbarkeit und neurochemischer Code . . . . .	29
3.5	Neurochemischer Code und Axonprojektion der Neurone . . . . .	31
3.6	Serotoninwirkung bei verschiedenen Neuronenklassen . . . . .	41
3.7	Noradrenalinwirkung bei verschiedenen Neuronenklassen . . . . .	49
3.8	Glycinwirkung bei verschiedenen Neuronenklassen . . . . .	53

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Lage des Präparates und Schemazeichnung des Versuchsaufbaus.	10
3.1	Neuron mit langsamer erregender Antwort (sEPSP)	24
3.2	Gastric-I Neuron, Immunhistochemie	27
3.3	Gastric-II Neuron, Immunhistochemie	28
3.4	Wirkung des 5-HT <sub>3</sub> -Antagonisten ICS-205-930	34
3.5	Desensibilisierung des 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptors	35
3.6	5-HT <sub>1P</sub> Antwort, Immunhistochemie des Neurons	36
3.7	5-HT <sub>3</sub> Antwort, Immunhistochemie des Neurons	38
3.8	Projektion von Neuronen mit verschiedenen 5-HT Antworten	39
3.9	5-HT Antwort, Neurochemischer Code und Projektion der Neurone	40
3.10	Wirkung von 2-methyl-5-HT und 5-OHIP bei Motilitätsmessungen.	42
3.11	Wirkung verschiedener Konzentrationen von 5-HT Agonisten bei Motilitätsmessungen.	43
3.12	Wirkung verschiedener Konzentrationen von 5-HT Agonisten auf den Basistonus.	44
3.13	$\alpha_1$ -Rezeptor vermittelte Antwort auf Noradrenalin	45
3.14	Hyperpolarisation durch Noradrenalin	46
3.15	Präsynaptische Hemmung durch Noradrenalin	48
3.16	Hemmung einer schnellen synaptischen Antwort durch Perfusion mit 1 mM Nitroprussid	51
3.17	Glycinwirkung, Desensibilisierung	54
3.18	Glycinwirkung, Blockade durch Strychnin	55

## Abkürzungen

**5-HT** Serotonin (5-Hydroxytryptamin)

**5-HTP-DP** N-Acetyl-5-Hydroxytryptophyl-5-Hydroxytryptophan Amid

**5-OHIP** 5-Hydroxyindalpin

**AH** Nachhyperpolarisation

**AMCA** 7-Amino-4-Methylcumarin-3-Essigsäure

**Calret** Calretinin

**ChAT** Cholinacetyl-Transferase

**Cy3** Carboxymethylindocyanin

**Cy5** Indodicarbocyanin

**DBH** Dopamin- $\beta$ -hydroxylase

**DTAF** Dichlortriazinyl-Aminofluorescein

**ENK** Enkephalin

**ENS** Enterisches Nervensystem

**fEPSP** Schnelle erregende postsynaptische Antwort

**FITC** Fluorescein-Isothiocyanat

**NOS** Stickoxidsynthase (Nitric-oxide Synthase)

**NPY** Neuropeptid Y

**PBS** Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)

**sEPSP** Langsame erregende postsynaptische Antwort

**SOM** Somatostatin

**SP** Substanz P

**TH** Tyrosinhydroxylase

**VIP** Vasoaktives Intestinales Polypeptid

# Kapitel 1

## Einleitung

Der Magen-Darmtrakt besitzt intrinsische nervale Steuerungsmechanismen, an denen verschiedene Neurotransmitter und Neuromodulatoren beteiligt sind und die dem Magen-Darmtrakt ein hohes Maß an Autonomie verleihen. Zusätzlich zu diesen intrinsischen Einflüssen ist eine extrinsische Modulation der Funktionen des Magen-Darmtraktes möglich, die durch das sympathische bzw. parasympathische Nervensystem vermittelt wird. Störungen der intrinsischen und extrinsischen Innervation können zu einer Vielzahl von Krankheiten führen [GOYAL und HIRANO 1996]. Aufgrund der daraus resultierenden klinischen Bedeutung nervaler Regulationsmechanismen wird das Zusammenspiel und die Rolle der beteiligten Nervenstrukturen intensiv erforscht.

Die Hauptaufgabe des Magen-Darmtraktes ist die Verdauung von zugeführter Nahrung. Zu diesem Zweck müssen bestimmte motorische Funktionen und Sekretionsvorgänge in dynamischer (den Gegebenheiten angepaßter) und koordinierter Weise ablaufen. Da diese Vorgänge weitgehend unwillkürlich verlaufen, ordnete man die Kontrolle dieses Systems dem autonomen Nervensystem zu. Dem Magen-Darmtrakt wurde aufgrund seiner spezifischen Innervation jedoch schon früh eine besondere Rolle zugeschrieben. Er besitzt ein außerordentlich komplexes Nervengeflecht, das in der Wand des Magen-Darmtraktes angesiedelt und in zwei Plexus organisiert ist: Der Plexus submucosus (Meissnersche Plexus) befindet sich zwischen Zirkulärmuskulatur und Mukosa, während der Plexus myentericus (Auerbachsche Plexus) zwischen Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur angesiedelt ist. Beide Plexus bestehen aus Neuronen, die in Ganglien variabler Größe organisiert sind. Ein dichtes Netzwerk von Fasersträngen verbindet die Neurone untereinander und mit Effektororganen bzw. mit anderen Teilen des autonomen Nervensystems. Die Zahl, der in diesen Plexus organisierten Neurone (ca. 200 Millionen [WOOD 1994]), ist bei kleineren Säugern etwa gleich der Zahl der Neurone im Rückenmark. Im Vergleich dazu ist die Zahl der

efferen parasymphischen Fasern, die zum Magen-Darmtrakt laufen, relativ klein (ca. 7000 [PRECHTL und POWLEY 1990]). Außerdem schwankt die direkte Innervationsdichte durch Sympathikus und Parasympathikus entlang des Magen-Darmtraktes stark. Sie ist am höchsten für Ösophagus, Magen (Ganglion coeliacum bzw. N. laryngeus superior und N. vagus) und distales Kolon (Ganglion mesentericum inferius bzw. Nn. pelvici) und erheblich kleiner im Bereich des Dünndarms. Aus diesen anatomischen Gegebenheiten schloß man schon früh, daß es sich bei diesem Nervengeflecht wahrscheinlich nicht um eine einfache, postganglionäre Struktur des autonomen Nervensystems handelt. Um diese Sonderstellung zu dokumentieren, führte Langley den Begriff des 'enterischen Nervensystems' (ENS) ein [LANGLEY 1921]. Experimente mit vagotomisierten Tieren belegten, daß der Magen-Darmtrakt seine Funktionen ohne parasymphischen Einfluß ausüben kann. Auch nach einer Sympathektomie oder bei dezentralisierten Tieren kommt es noch zu koordinierten motorischen Aktivitäten des Darms [HASHMONAI et al. 1987]. Diese phänomenologischen und anatomischen Beobachtungen führten schließlich zu einem Konzept, in dem das enterische Nervensystem im autonomen Nervensystem eine funktionell eigenständige Rolle neben Sympathikus und Parasympathikus spielt. J. D. Wood, der maßgeblich an der Entwicklung dieses Konzeptes beteiligt war, prägte hierfür den Begriff des *Bauchgehirns* ('little brain in the gut' [WOOD 1994]). Um unabhängig funktionieren zu können braucht das enterische Nervensystem mindestens drei Komponenten [WOOD 1994]:

- Chemo- und Mechanosensoren, die Informationen in der Wand des Magen-Darmtraktes aufnehmen,
- Interneurone, die diese Informationen verarbeiten und weiterleiten und
- Motorneurone, die durch Interneurone oder sensorische Neurone angesteuert werden und für die Aktivität von Muskulatur und Sekretionsvorgänge verantwortlich sind.

Dieses Konzept beruhte ursprünglich nur auf den bisher dargestellten allgemeinen Überlegungen und funktionellen Untersuchungen an isolierten Darmsegmenten, die immer noch zum gerichteten Transport eines Bolus fähig waren [LANGLEY und MAGNUS 1905, MAGNUS 1908]. Möglichkeiten zur Identifizierung der neuronalen Schaltkreise des ENS ergaben sich jedoch erst durch die Anwendung und Kombination elektrophysiologischer, neurochemischer und neuropharmakologischer Techniken.

Die meisten Untersuchungen dieser Art wurden bisher am Magen-Darmtrakt des Meerschweinchens durchgeführt. Hier war es möglich, un-

terschiedliche Neuronengruppen anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften [MESSENGER et al. 1994, BORNSTEIN et al. 1994, WOOD 1994], ihres Gehaltes an verschiedenen Neurotransmittern (neurochemischer Code [SCHEMANN et al. 1995, COSTA et al. 1996, TIMMERMANS et al. 1997]), der Projektionspräferenz [COSTA et al. 1992b, SCHEMANN und SCHAAF 1995] ihrer Axone oder ihrer wahrscheinlichen Funktion zu identifizieren [WOOD 1994]. Aus den Ergebnissen solcher Studien wurden Modelle zur Regulation motorischer Funktionen durch enterische Schaltkreise entwickelt. Eine wichtige Funktion stellt z.B. der peristaltische Reflex dar, der die Grundlage jedes Motilitätsmusters im Magen-Darmkanal ist. Er kann durch mechanische oder chemische Reize ausgelöst werden und dient primär dem Transport von Magen- oder Darminhalt. Dazu werden Muskelpartien oral und anal des Reizortes in stereotyper Weise gesteuert: Auf der oralen Seite des Reizes kommt es zu einer Kontraktion und auf der analen Seite zu einer Relaxation der Muskulatur. Dies führt zu einem Transport des Inhaltes in analer Richtung, der auch noch bei isolierten Darmsegmenten funktioniert [BAYLISS und STARLING 1899, LANGLEY und MAGNUS 1905]. Der peristaltische Reflex stellt ein motorisches Muster dar, das im ganzen Magen-Darmtrakt vorhanden ist. Dieser polarisierte Reflex wird durch oral projizierende, cholinerge (erregende) und anal projizierende, nitroxiderge (hemmende) Motorneurone vermittelt [SCHEMANN und SCHAAF 1995, COSTA et al. 1996]. Diese Motorneurone stellen jedoch nur den letzten Abschnitt der beteiligten Reflexschaltkreise dar. Konzepte zu den steuernden neuronalen Mechanismen wurden erst in der letzten Zeit entwickelt.

Die Erforschung der regulatorischen Zusammenhänge wird im Magen-Darmtrakt dadurch erleichtert, daß neuronale Strukturen und ihre Effektoren nah beieinander liegen und relativ leicht zugänglich sind. Weiterhin gibt es Merkmale, die im ganzen Magen-Darmtrakt ähnlich vorhanden sind [TIMMERMANS et al. 1997], wie z.B. den oben geschilderten peristaltischen Reflex. Andererseits zeigt der Magen-Darmtrakt in seinem Verlauf eine große Variabilität in Aufbau, Innervation und neurochemischen Code der Neurone [BRODIN et al. 1983, STERNINI et al. 1987, BORNSTEIN und FURNESS 1988, BERTHOUD et al. 1991a, COSTA et al. 1992b, SCHEMANN et al. 1995]. Diese Unterschiede könnten damit zusammenhängen, daß sich das ENS auf die regionenspezifischen Funktionen der Abschnitte des Magen-Darmkanals adaptiert hat. Der Magen zeigt in Bezug auf seine Innervation einige Unterschiede im Vergleich zum restlichen Magen-Darmkanal. Das Meerschweinchen ist in dieser Hinsicht am besten untersucht, die meisten der folgenden Angaben beziehen sich daher auf diese Spezies. So ist z.B. die räumliche Orga-

nisation der enterischen Neurone im Magen anders als im restlichen Magen-Darmkanal. Ein submuköser Plexus fehlt im Magen bzw. ist nur sehr schwach ausgeprägt [GRUNDY und SCHEMANN 1992]. Der myenterische Plexus hat eine ähnliche Dichte wie im restlichen Gastrointestinaltrakt. Er besteht aus Interneuronen, die andere enterische Neurone innervieren sowie spezifischen Populationen von Motorneuronen, welche Muskulatur oder Mukosa innervieren [FURNESS et al. 1991, SCHEMANN und SCHAAF 1995]. Intrinsische sensorische Neurone wurden im Magen noch nicht identifiziert. Die Neurone des Magens weisen nicht so viele morphologische Gruppen auf, wie in anderen Teilen des Magen-Darmtraktes. Es gibt im wesentlichen zwei morphologische Typen. Beide sind unipolar, d.h. sie besitzen nur ein Axon und unterscheiden sich in der Morphologie ihrer Dendriten. Die Axone mancher Neurone bilden Kollaterale, die verschiedene Zielgewebe innervieren [SCHEMANN und SCHAAF 1995]. Dagegen sind in anderen Regionen des Magen-Darmtraktes mehr morphologische Gruppen unterscheidbar. Dazu zählen Neurone mit unterschiedlichen Dendritenformen und auch multipolare, multiaxonale Neurone [STACH 1989, MESSENGER et al. 1994].

Nach ihrer Reaktion auf die Injektion von depolarisierenden Strompulsen können Neurone im Korpus des Magens in tonisch erregbare Gastric-I, phasisch erregbare Gastric-II und nicht erregbare Gastric-III Neurone eingeteilt werden [SCHEMANN und WOOD 1989a] (näheres S. 12). Darüber hinaus haben alle diese Neurone synaptische Kontakte, die über nicotinerge Rezeptoren vermittelt werden [SCHEMANN und WOOD 1989b]. Aktionspotentiale entstehen primär durch Einstrom von Natrium [SCHEMANN und WOOD 1989a]. Neurone des Darms gehören im allgemeinen entweder zur Klasse der tonisch erregbaren S-Neurone oder der AH-Neurone, deren kalziumabhängige Aktionspotentiale von einer mehrere Sekunden anhaltenden Nachhyperpolarisation begleitet sind [HIRST et al. 1985b, HIRST et al. 1985a]). Während S-Neurone nach synaptischer Stimulation schnelle erregende Antworten (fEPSP's) zeigen, haben AH-Neuronen keine fEPSP's [BORNSTEIN et al. 1994].

In den Neuronen des ENS lassen sich klassische Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin) und Neuromodulatoren immunhistochemisch nachweisen. Beide Substanzgruppen werden im folgenden vereinfachend als neuronale Marker bezeichnet. Häufig sind in einem Neuron mehrere dieser Marker gleichzeitig vorhanden. Diese Eigenschaft wird als *neurochemischer Code* der Neurone bezeichnet und ist teilweise funktions- und regionenspezifisch. Im Meerschweinchenmagen sind 10 verschiedene Marker nachgewiesen [SCHEMANN et al. 1995]. Dies sind: Acetylcholin (ChAT, Cholinacetyltransferase), Enkephalin (ENK), Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), Neuropeptid Y (NPY), Substanz

P, (SP), Stickoxid (NOS, Stickoxidsynthase), Calretinin (Calret), Somatostatin (SOM), Serotonin (5-HT, 5-Hydroxytryptamin). In einer weiteren Subpopulation von Neuronen ist Dopamin- $\beta$ -hydroxylase (DBH) vorhanden, ein Enzym der Noradrenalinsynthese. Da sich in diesen Neuronen jedoch keine Tyrosinhydroxylase (TH) nachweisen läßt, ist unklar ob sie tatsächlich Noradrenalin synthetisieren können [SCHEMANN et al. 1995]. Diese Marker bilden die folgenden zehn neurochemischen Codes: NOS/VIP/NPY/ENK (28 %), NOS/- (2 %), ChAT/VIP/NPY/DBH (11 %), ChAT/SP/ENK (21 %), ChAT/SP/ENK/Calret (5 %), ChAT/SP/SOM/ $\pm$ Calret (6 %), ChAT/- (21 %), 5-HT/ $\pm$ SP/ $\pm$ VIP/(ChAT) (2 %), (nach [SCHEMANN et al. 1995]). ChAT/- bzw. NOS/- bedeuten, daß in diesen Gruppen nur ChAT bzw. NOS und keiner der anderen getesteten Marker nachgewiesen wurde. (ChAT) bedeutet, daß das Vorhandensein von ChAT nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (siehe auch Tabelle 2.1, S.15).

Die Ermittlung des neurochemischen Codes wird dadurch erleichtert, daß sowohl eine positive als auch eine negative Färbung Aufschluß über den Code eines Neurons gibt. So reicht die Färbung mit einer kleinen Zahl bestimmter Schlüsselantigene aus, um einen neurochemischen Code zu bestimmen. Da sich beispielsweise ChAT und NOS in einer Zelle ausschließen, muß eine ChAT-negative Zelle also NOS-positiv sein [SCHEMANN et al. 1995].

Den beschriebenen 10 Populationen im Magen stehen im Meerschweinchen-Dünndarm mindestens 14 Populationen gegenüber [COSTA et al. 1992a]. Dabei unterscheiden sich sowohl die vertretenen Marker als auch deren mögliche Kombinationen in einem Neuron. Während es im Dünndarm beispielsweise eine etwa 25 % große Population von Neuronen mit dem Marker Calbindin gibt, tritt diese im Korpus des Magen nicht auf. Dafür gibt es im Magen eine 39 % große Gruppe von Neuronen, in denen vasoaktives intestinales Polypeptid und Neuropeptid Y kolokalisiert sind. Eine Kombination, die in dieser Größe sonst nicht im Darm zu finden ist. Eine Gemeinsamkeit scheint jedoch im gesamten ENS vertreten zu sein: Die Neurone lassen sich in zwei große Klassen einteilen, von denen die eine immer ChAT-positiv ist, evtl. in Kombination mit anderen Markern. Die Neurone der anderen Klasse sind NOS-positiv und können ebenfalls noch andere Marker enthalten.

Die extrinsische Innervation des Magen-Darmkanals ist ebenfalls nicht einheitlich. Studien an Ratten [BERTHOUD et al. 1991b, BERTHOUD et al. 1991a] zeigen eine sehr dichte parasymphatische Innervation des Magens im Gegensatz zu anderen Teilen des Magen-Darmtraktes. Diese Befunde werden gestützt durch elektrophysiologische Untersuchungen im Korpus des Meerschweinchenmagens in denen gezeigt wurde, daß ein großer Anteil der myen-

terischen Neurone des Korpus von Fasern des N. Vagus innerviert werden [SCHEMANN und GRUNDY 1992].

Diese Unterschiede könnten mit den besonderen Aufgaben des Magens zusammenhängen. Der Magen bildet das Reservoir für die zugeführte Nahrung. Er relaxiert bei Aufnahme von Nahrung über einen intrinsischen und einen vagusabhängigen Reflexkreis. Der intrinsische Mechanismus bewirkt die sogenannte adaptive Relaxation durch die sich der Magen an die aufgenommene Nahrungsmenge anpaßt [DESAI et al. 1991a]. Der vagusabhängige Reflexkreis bewirkt die rezeptive Relaxation und wird ausgelöst wenn Nahrung Pharynx und Ösophagus passiert [DESAI et al. 1991b]. Durch Propulsion und Retropulsion sorgt der Magen für eine Durchmischung und Zerkleinerung des Mageninhaltes. Er sezerniert Salzsäure und Verdauungsenzyme (Pepsinogen), spielt jedoch kaum eine Rolle bei der Flüssigkeits- oder Nährstoffresorption.

Die funktionelle Bedeutung von potentiellen Neurotransmittern und Neuromodulatoren des ENS kann durch Organbadversuche *in vitro* oder durch Tierversuche *in vivo* untersucht werden. Aus solchen Experimenten läßt sich allerdings nicht immer auf die beteiligten Rezeptoren schließen und zwischen einer neuronal vermittelten oder direkten Wirkung auf Muskulatur oder Mukosa unterscheiden. Durch die Kombination von elektrophysiologischen und immunhistochemischen Methoden kann die Wirkung von Neurotransmittern und -mediatoren auf neuronaler Ebene untersucht werden. Zusätzlich lassen sich die elektrophysiologisch und pharmakologisch charakterisierten Neurone nach Projektionsrichtung, neurochemischem Code und innerviertem Zielgewebe klassifizieren. Mit diesen Mitteln sollten in der vorliegenden Arbeit intrinsische neuronale Schaltkreise des Meerschweinchenmagens und ihre Modulation durch ausgewählte neuroaktive Substanzen untersucht werden. Die verwendeten Substanzen sollten physiologisch relevant sein und ihre Wirkung durch verschiedene Rezeptortypen und/oder an Teilpopulationen der myenterischen Neurone entfalten. Zu diesem Zweck wurden die Wirkungen von Serotonin, Noradrenalin, Stickoxid und Glycin auf Neurone des Magens untersucht und mit anderen Eigenschaften der Neurone korreliert.

Serotonin ist im Gastrointestinaltrakt in großer Menge vorhanden. Es zeigt *in vivo* und *in vitro* vielfältige Wirkungen und stellt wahrscheinlich einen wichtigen intrinsischen Einfluß des Magen-Darmtraktes dar. Im ENS sind verschiedene Rezeptortypen für Serotonin mit prä- und postsynaptischer Wirkung nachgewiesen [SCHEMANN 1991a, GALLIGAN und NORTH 1991, TACK et al. 1992]. Noradrenalin vermittelt die Wirkung des sympathischen Nervensystems und stellt einen wichtigen extrinsischen Einfluß dar, der ebenfalls durch verschiedene Rezeptortypen vermittelt wird [NORTH und SURPRENANT 1985,

SCHEMANN 1991b, TACK und WOOD 1992, DOBREVA et al. 1998]. Stickoxid kann von etwa einem Drittel der Neurone des Magens synthetisiert werden [SCHEMANN et al. 1995]. Es wirkt hemmend auf die Motilität und seine Freisetzung wird neural gesteuert [DESAI et al. 1991a]. Bislang ist jedoch unbekannt ob es im Magen nur auf die Muskulatur oder auch auf Neurone wirkt. Glycin ist ein Vertreter der Aminosäuretransmitter, die wichtige Rollen im zentralen Nervensystem spielen. Für Glutamat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure wurden Wirkungen im ENS beschrieben [CHERUBINI und NORTH 1984b, CHERUBINI und NORTH 1984a, LIU et al. 1997], während die Wirkung von Glycin auf Neurone des peripheren Nervensystems und insbesondere des ENS wenig untersucht und teilweise widersprüchlich ist [MAYER et al. 1982, CHERUBINI und NORTH 1984a]. Im ZNS und zumindest in Teilen des peripheren Nervensystems [ZHANG und BERG 1995] wirkt Glycin hemmend durch die Aktivierung von Chlorid-Kanälen, die das Membranpotential der Neurone hyperpolarisieren. Angaben aus der Literatur [MAYER et al. 1982] und Vorversuche an Kolonpräparaten zeigten jedoch eine depolarisierende Wirkung von Glycin an Neuronen des ENS. Da Glycin in Nahrungsmitteln und im Blut vorkommt, sollte eine mögliche Rolle von Glycin als Neurotransmitter oder -modulator im Magen untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war die elektrophysiologische, neuropharmakologische, funktionelle und neurochemische Charakterisierung von enterischen Nervenzellen des Magens. Die Ergebnisse sollten Aufschluß über mögliche, differentielle Beeinflussungen verschiedener Nervenzellpopulationen durch ausgewählte Neurotransmitter geben. Diese Zusammenhänge könnten das Verständnis der intrinsischen Regulation von Verdauungsvorgängen erleichtern.

## Kapitel 2

# Material und Methoden

### 2.1 Präparation

Im folgenden erwähnte Chemikalien und Lösungen sind im Abschnitt über Lösungen (siehe S. 21) beschrieben. Als Versuchsmaterial dienten Teile der Magenwand des Meerschweinchenmagens. Männliche Meerschweinchen (Alter: 1-2 Monate, Gewicht: 180 g - 300 g) wurden durch Genickbruch getötet und nach Durchtrennen der Halsschlagader ausgeblutet. Bauch- und Brustraum wurden geöffnet und der Magen mit einem möglichst langen Stück Ösophagus entnommen. Dabei wurden die zwei zum Magen ziehende Äste des N. Vagus erhalten. Diese laufen entlang des Ösophagus und verzweigen erst kurz über dem unteren Ösophagussphinkter im Bindegewebe. Dann wurde ein Stück der parietalen Magenwand mit Ösophagus herausgeschnitten (Abb. 2.1) und in eine Präparierschale verbracht. Diese war zum Aufspannen des Gewebes mit einem Silikonkunststoff (Sylgard 184, Dow Corning, USA) ausgegossen und wurde während der Präparation mit gekühlter Krebslösung im Kreislaufverfahren superfundiert. Die weitere Präparation fand unter einem Präparationsmikroskop (SZ40, Olympus, Hamburg) bei 7x bis 40x Vergrößerung statt. Der Vagusast, welcher den parietalen Bereich des Magens innerviert, wurde vom Ösophagus mit dem Präparationsbesteck (Pinzette Dumont No. 5, feine gebogene Irischere, Fine Science Tools Heidelberg) vorsichtig gelöst und der Ösophagus in Höhe des unteren Ösophagussphinkters abgetrennt. Dann wurde das Gewebe mit Hilfe von feinen Nadeln (Minutien Pins, Edelstahl, 0,2 mm Durchmesser, Fine Science Tools Inc.) mit der Mukosa nach oben in der Schale aufgespannt und die Mukosa mit dem Präparierbesteck entfernt. Um den myenterischen Plexus freizulegen mußte nun in einem Streifen von 2-3 mm Breite das Bindegewebe und die Zirkulärmuskulatur entfernt werden. Der myenterische Plexus verblieb dabei auf der Longitudinalmuskulatur. Für die Stimulation des N. Va-

gus mußte dieser am Ende von seiner Bindegewebshülle befreit werden. Dabei wurde darauf geachtet, den Nerv so wenig wie möglich mechanisch zu beanspruchen. Ein etwa 15 x 20 mm großes Stück dieses Präparates, mit N. Vagus und dem freiliegendem Plexusstreifen in der Mitte, wurde ausgeschnitten und in einer Versuchskammer unter ähnlichem Zug erneut aufgespannt. Der N. Vagus konnte durch ein Loch in der Kammerwand in einer zweiten, kleineren Kammer auf Stimulationselektroden gelegt werden. Um diese Elektroden nicht durch Krebslösung kurzzuschließen und den Nerv feucht zu halten, wurde die Kammer mit Paraffinöl gefüllt. Die Verbindung zwischen den Kammern wurde mit Vaseline abgedichtet, die auch gleichzeitig als Polster für den Vagusnerv diente. Die Kammer konnte nun auf dem Objektisch eines Inversmikroskops (IMT 2, Olympus, Hamburg) plaziert werden. Das Mikroskop stand auf einem schwingungsfreien Tisch (T-250 mit Niveauregulierung T-260, Physik Instrumente GmbH und Co., Waldbronn), der von einem Faraday-Käfig umgeben war. Während des Versuchs wurde die Meßkammer mit warmer (37 °C), ständig begaster Krebslösung (Carbogen, 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>), im Kreislaufverfahren superfundiert (ca. 8 ml/min). Der Krebslösung war Nifedipin in einer Endkonzentration von 1 µM zugesetzt, um Muskelkontraktionen zu unterdrücken. Da die Aktivität von Nifedipin unter Lichteinwirkung nachläßt, mußte während des Versuchs gelegentlich nachdosiert werden. Die Gesamtkonzentration überstieg jedoch nie 3 µM. Das Mikroskop war mit einer Hoffman-Modulationsoptik (Modulation Optics Inc., Greenvale, USA) ausgestattet, mit der die Ganglien des myenterischen Plexus bei Vergrößerungen von 40x bis 100x deutlich erkennbar waren. Da trotz der Gabe von Nifedipin noch Muskelkontraktionen stattfinden konnten, wurde jeweils ein Ganglion durch sanften Druck mit zwei L-förmigen Druckfüßen [WOOD und MAYER 1978] immobilisiert. Die Druckfüße wurden paarweise aus Edeldraht (Orthodontic Wire Tru-Chrome, RMO, Denver, USA) durch elektrolytische Spitzenerosion in 33 % Salzsäure selbst hergestellt. Sie wurden durch einen Mikromanipulator an das Ganglion gebracht, abgesenkt und um wenige µm gespreizt.

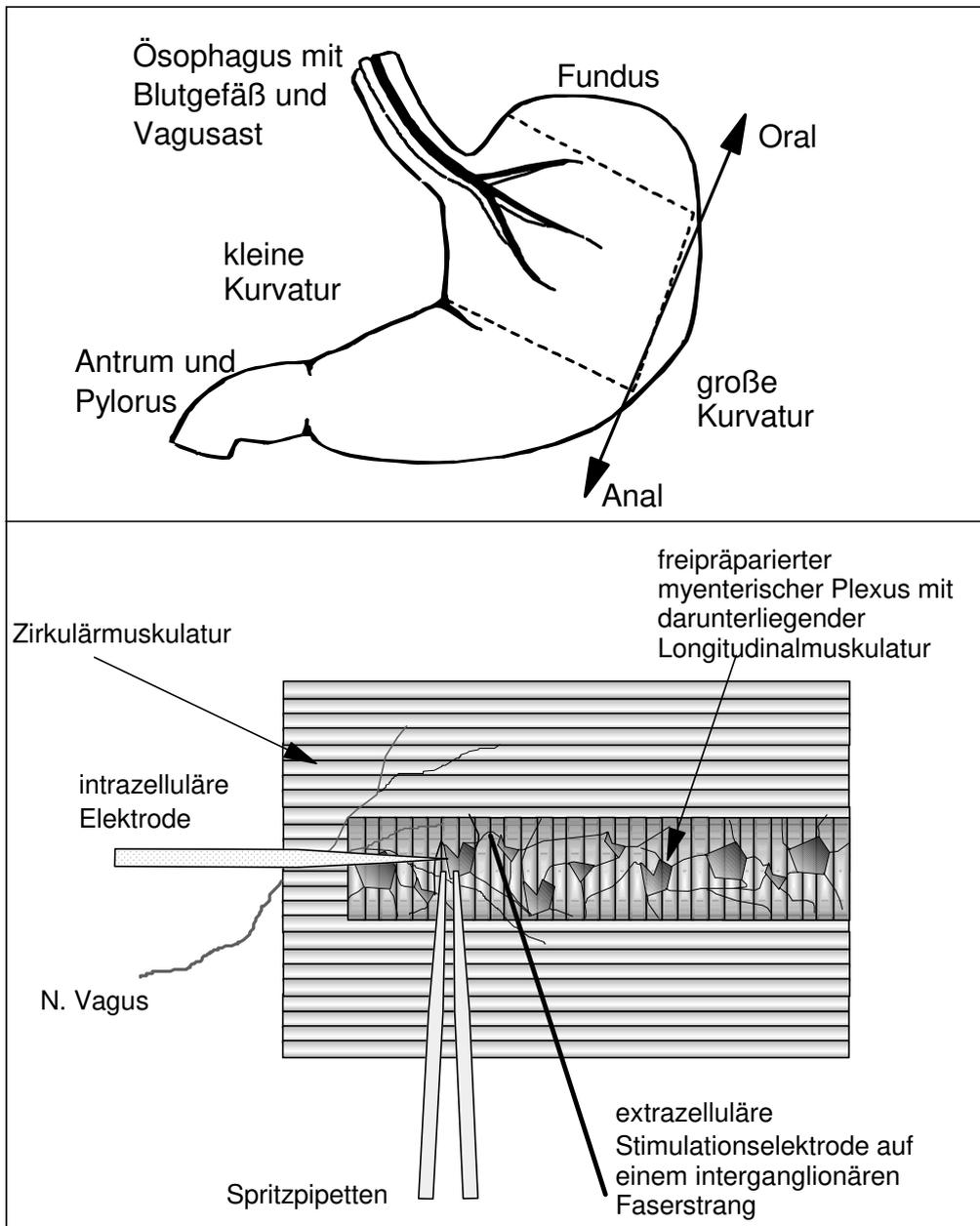


Abbildung 2.1: Der obere Teil zeigt schematisch einen Meerschweinchenmagen. Die Lage des Präparates ist mit gestrichelten Linien eingezeichnet. Orale und anale Richtung sind durch Pfeile angedeutet. Im unteren Teil ist ein Schema des Versuchsaufbaus gezeigt. Das Präparat, in dem ein Teil des myenterischen Plexus freigelegt war, wurde am Boden einer Perfusionskammer mit Nadeln fixiert (nicht eingezeichnet). Das jeweils betreffende Ganglion wurde zusätzlich mit Druckfüßen immobilisiert (nicht eingezeichnet). Mit der intrazellulären Elektrode wurde ein Neuron angestochen. Es konnte synaptisch über den N. Vagus bzw. die extrazelluläre Elektrode stimuliert werden. Außerdem konnten Pharmaka durch die Spritzpipetten appliziert werden (nicht maßstabsgetreu).

## 2.2 Elektrophysiologie

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden folgende Geräte und Techniken verwendet:

**Elektrodinglas** Borsilikat-Glas Kapillaren mit Filament. Außendurchmesser: 1 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm ('Kwik-Fil' 1B100F-4, WPI, Berlin)

**Elektrodenpuller** Flaming Brown Puller, Modell P-87 (Sutter Instruments, San Rafael, USA). Die Elektroden hatten bei Füllung mit gepufferter 0,5 M KCl-Lösung Widerstände zwischen 150 M $\Omega$  und 250 M $\Omega$ .

**Elektrodenmanipulator** Motorischer 3-Achsen Manipulator mit Steuergerät PM-10 (beides Fa. Märzheuser, Wetzlar). Elektromotoren zur groben Positionierung der Elektrode und Piezo-Schrittmotor zum Anstechen der Neurone.

**Verstärker** Intra 767 (WPI) zum Verstärken der abgeleiteten Signale. Über den Verstärker konnten angestochene Neurone durch Strominjektion de- oder hyperpolarisiert werden.

**Oszilloskop** DSO 420 (Gould, Dietzenbach) zum Betrachten der abgeleiteten Signale.

**Schreiber** TA 11 (Gould) zur Registrierung langfristiger Veränderungen im Membranpotential. Aufgezeichnet wurden Membranpotential, injizierter Strom und die Applikation von Pharmaka über Spritzpipetten.

**Datenaufzeichnung** Digitalrecorder DTR 1202 (Biological Science Instruments, Claix, Frankreich). Der Recorder hatte zwei digitale Kanäle, auf denen Membranpotential und injizierter Strom aufgezeichnet wurden. Auf einem dritten, analogen Kanal wurden über ein Mikrofon Kommentare aufgezeichnet.

**Stimulation** Die Neurone konnten auf mehrere Arten stimuliert werden:

**Intrazellulär** Über einen Impulsgenerator (A 310, WPI) und den Verstärker konnten Stromimpulse variabler Amplitude und Länge in die Zelle injiziert werden.

**Synaptisch, intrinsisch** Nervenfasern des Präparates wurden mit einem Stimulator (S88, Grass Medical Instruments, Quincy, USA) und Isolationseinheit (SIU-5, Grass Medical Instruments) mit Spannungsimpulsen stimuliert. Die Übertragung fand mit einem teflonisierten Silberdraht (25  $\mu$ m Durchmesser) statt, der mit Hilfe eines

Mikromanipulators auf interganglionäre Nervenstränge plaziert wurde.

**Synaptisch, extrinsisch** Der N. Vagus wurde über eine gleiche Kombination von Taktgeber und Isolationseinheit stimuliert wie für die intrinsische Stimulation.

**Pharmaka** Glaselektroden wurden mit einer Mischung des Farbstoffes Fast Green (siehe Kap. 2.7) und dem entsprechenden Pharmakon gefüllt. Die Stammlösungen der Pharmaka wurden jeweils in Krebslösung auf die entsprechende Spritzenkonzentration verdünnt. Um Spritzpipetten zu erhalten wurde die Spitze der gefüllten Glaselektroden abgebrochen. Diese konnten in einen Halter eingesetzt werden, der mit einem Druckluftgeber verbunden war. Mit einem Mikromanipulator ließen sich die Pipetten in einer Entfernung von ca. 50  $\mu\text{m}$  von der angestochenen Zelle plazieren. Über ein Steuergerät konnten Druckimpulse (150 kPa) variabler Länge (50 ms - 1000 ms) auf die Spritzpipette gegeben werden, die zu einer Mikroejektion des Wirkstoffes mit einer Rate von  $15,4 \pm 11,6$  nl/s ( $n=4$ ) führten. Durch den Farbstoff konnte im Mikroskop Austritt und Verteilung des Wirkstoffes beobachtet werden. Es standen Halter und Steuergerät für drei Spritzpipetten zur Verfügung. Pharmaka konnten auch über das Perfusionssystem gegeben werden.

Um die Neurone während der Elektrophysiologie markieren zu können, wurden die Spitzen der Elektroden mit einer Neurobiotinlösung (siehe Kap. 2.7) gefüllt. Dies geschah indem die Elektroden nach dem Ziehvorgang mit ihrer Rückseite in einem Eppendorf-Cup in die Neurobiotinlösung getaucht wurden. Durch Kapillarkräfte wurde ein Teil der Lösung bis in die Spitze gesogen. Der Rest der Elektrode wurde dann unmittelbar vor der Verwendung mit Kaliumchlorid-Lösung gefüllt. Um ein Verstopfen der Elektrode zu vermeiden wurde dabei ein Spritzenfilter mit 0,22  $\mu\text{m}$  Porengröße benutzt.

Nach Anstich einer Zelle wurde zunächst mit Hilfe von depolarisierenden Strompulsen (Stromstärke: 0,3 nA, Pulsdauer: 300 ms, Frequenz: 1/3 Hz, insgesamt 3 min) Neurobiotin in die Zelle injiziert. Danach wurde die Erregbarkeit der Zelle nach der Zahl der Aktionspotentiale bei depolarisierenden Pulsen (0,1 nA - 0,3 nA, 300 ms Dauer) festgestellt. Gastric-I Neurone sind tonisch erregbar und feuern dabei mehr als drei Aktionspotentiale. Ihre Entladungsfrequenz ist proportional zur Amplitude des injizierten Strompulses. Gastric-II Neurone sind phasisch erregbar (ein bis drei Aktionspotentiale) und die nicht erregbaren Gastric-III Neurone zeigen bei depolarisierenden Pulsen keine Aktionspotentia-

le. Gastric-III Neurone mußten aber wenigstens über die intrinsische Elektrode oder über Stimulation des N. Vagus erregbar sein. Grundsätzlich wurden nur Neurone gewertet, die nach dem Füllen über die Dauer des Versuchs ein stabiles Membranpotential  $\leq -40$  mV behielten und ihre Erregbarkeit nicht veränderten. Als nächstes wurde geprüft ob die Zelle über intrinsische Fasern oder über den N. Vagus (extrinsisch) stimulierbar war. In vielen Fällen konnte die extrazelluläre Elektrode während der Ableitung von einer Zelle auf mehrere Faserstränge plaziert werden. Die Stimulation erfolgte durch Spannungspulse mit konstanter Amplitude (Pulsängen und Amplituden: Intrinsisch 300  $\mu$ s, bis 15 V; N. Vagus 500  $\mu$ s, bis 150 V). Meist konnten bei der Stimulation Aktionspotentiale ausgelöst werden; manchmal kam es auch nur zu einer unterschwelligen schnellen, erregenden postsynaptischen Potentialänderung (fast excitatory postsynaptic potential, fEPSP). Mit der Gabe von Pulsfolgen auf intrinsische Nervenfasern wurde das Auftreten von langsamen postsynaptischen Antworten geprüft (slow excitatory postsynaptic potential, sEPSP) (Pulse wie oben, Frequenz 10 - 40 Hz, Dauer 1 - 4 s). Die Gabe von Pulsfolgen auf den N. Vagus führte meist auch zu einer Stimulation der Muskulatur mit Bewegungen des Präparates und einem Verlust der Zelle. Diese Untersuchung wurde daher nur selten bzw. zum Schluß des Experiments durchgeführt. Wenn an einem Neuron keine Reaktion nach Stimulation des N. Vagus auftrat, konnte dies auch an einer Beschädigung des empfindlichen Nervs liegen. In solchen Fällen war zu erwarten, daß sich in keinem Neuron des Präparates eine Stimulation auf diesem Wege auslösen ließ. Neurone ohne Input durch den N. Vagus wurden daher nur in die Auswertung eingeschlossen, wenn sich mindestens ein Neuron des Präparates durch Reizung des N. Vagus stimulieren ließ.

Schließlich erfolgte die Spritzapplikation der Pharmaka, um deren post- oder präsynaptische Wirkung analysieren zu können. Dazu wurde auf Veränderungen von Membranpotential und -widerstand sowie Änderungen der Antwort bei Stimulation von Nervenfasern oder des N. Vagus geachtet. Eine vermutete präsynaptische Hemmung konnte geprüft werden, indem auf das gehemmte Neuron Acetylcholin mit einer Spritzpipette appliziert wurde. Wenn dies noch eine postsynaptische Antwort auslöste, wurde geschlossen, daß die Hemmung auf präsynaptischen Mechanismen beruhte.

Zur Charakterisierung spezifischer Rezeptoren wurden Antagonisten zur Superfusionslösung gegeben. Die Reaktion auf ein Pharmakon mußte durch den Antagonisten gehemmt werden und nach einer Auswaschperiode wieder zu reproduzieren sein. Die Auswaschperioden waren u.U. sehr lang und mit der Gefahr des Verlustes des Neurons verbunden. Daher wurde der Antagonist, der die Antwort bei Superfusion hemmte, in einigen Fällen durch eine Spritzpi-

ette appliziert. Die Antwort wurde in diesen Fällen nicht so stark gehemmt, kehrte jedoch dafür nach einer kürzeren Auswaschperiode zurück.

Die auf Band aufgezeichneten Daten konnten später über ein Analysesystem (MacLab 4s, Software Chart 3.5, beides von AD Instruments, Castle Hill, Australien) wiedergegeben und analysiert werden. Die Daten, für die in dieser Arbeit gezeigten Beispiele, wurden nicht gefiltert oder geglättet.

## 2.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung des Gewebes hatte folgende Ziele:

- Wiederfinden der mit Neurobiotin gefüllten Neurone.
- Identifizierung ihres neurochemischen Codes.
- Bestimmung der Projektionsrichtung des Axons.
- Bestimmung der Projektionslänge des Axons.
- Bestimmung des durch das Neuron innervierten Zielgewebes.

Außerdem wurde von den meisten Neuronen noch die Position auf dem Präparat protokolliert. Der Abstand vom linken Präparatrand gab damit gleichzeitig den Abstand der Neurone vom Ösophagusphinkter an. Dies ermöglichte einen Vergleich der Position der Neurone. Nach dem Versuch wurden die Gewebe entweder sofort fixiert (14 h bei 4 °C oder 4 h bei Raumtemperatur in Fixierlösung) oder 16 h unter Zusatz von 60  $\mu\text{M}/\text{l}$  Colchicin in Gewebekultur gehalten. Die Gewebekultur war zur immunhistochemischen Darstellung von Substanz P (SP) und Neuropeptid Y (NPY) in den Neuronen notwendig. Diese Peptide werden im Zellkörper produziert und in Vesikeln in die Peripherie transportiert, sind also im Zellkörper kaum nachweisbar. Colchicin ist ein Zellgift, welches den axonalen Transport behindert und damit zu einer Anreicherung der Peptide im Zellkörper führt. Diese Prozedur hatte jedoch oft auch eine Schädigung des Axons zur Folge. Durch die damit verbundene schwächere Färbung des Axons war es teilweise nicht mehr möglich, dieses bis zum Ende zu verfolgen und den funktionellen Typ der Zelle zu bestimmen.

Für die Gewebekultur wurde das Gewebe aus der Meßkammer ausgebaut und zunächst dreimal je 10 min auf einer Sicherheitswerkbank (HA 2472 GS, Heraeus, Hannover) in steriler Krebslösung gewaschen. Dann wurde es in einer sterilen Präparierschale (9 cm) erneut aufgespannt, mit 10 ml Kulturmedium mit der oben angegebenen Konzentration Colchicin bedeckt und in einem feuchten, begasten (5 %  $\text{CO}_2$  in Luft) Brutschrank (B 5061 EK/ $\text{CO}_2$ , Heraeus,

Tabelle 2.1: Mit den durchgeführten Färbungen identifizierbare neurochemische Codes

Ergebnis der Färbung	neurochemischer Code
ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$ /SP $\ominus$	ChAT/NPY/VIP/DBH
ChAT $\oplus$ /NPY $\ominus$ /SP $\ominus$	ChAT/-
ChAT $\oplus$ /NPY $\ominus$ /SP $\oplus$	ChAT/SP/ENK oder ChAT/SP/ENK/Calret oder ChAT/SP/SOM oder ChAT/SP/SOM/Calret
ChAT $\ominus$ /NPY $\oplus$ /SP $\ominus$	NOS/NPY/VIP/ENK
ChAT $\ominus$ /NPY $\ominus$ /SP $\ominus$	NOS/-
ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$ /DBH $\ominus$	ChAT/SP/ENK oder ChAT/SP/ENK/Calret oder ChAT/SP/SOM oder ChAT/SP/SOM/Calret
ChAT $\oplus$ /SP $\ominus$ /DBH $\oplus$	ChAT/NPY/VIP/DBH
ChAT $\oplus$ /SP $\ominus$ /DBH $\ominus$	ChAT/-

$\oplus$ : positive Färbung,  $\ominus$ : negative Färbung, ChAT/- kein weiterer Marker außer ChAT, NOS/- kein weiterer Marker außer NOS (nach [SCHEMANN et al. 1995]). Kombinationen die nicht existieren sind nicht aufgeführt.

Deutschland) 16 h inkubiert. Im Brutschrank standen die Präparate auf einem Horizontal-Rütteltisch, der sie mit ca. 1 Hz bewegte. Auf die Kulturschalen wurden statt der normalen Deckel umgekehrte Trichter gesetzt, die eine konstante Osmolarität des Kulturmediums garantierten. Nach der Gewebekultur wurde das Gewebe wie frisches Gewebe fixiert.

Für die Färbungen wurde folgende Prozedur angewendet (die benutzten Lösungen sind in 2.7 beschrieben):

- Waschen des fixierten Gewebes (dreimal je 10 min in 0,1 % Phosphatpuffer).
- Präinkubation in 0,1 % phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit Zusatz von 4 % Ziegenserum (Sigma) und 0,5 % Triton X-100 (Sigma).
- Inkubation mit einer Mischung primärer Antikörper in PBS mit Serum und Triton X-100 für 18 h bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:
  - Anti-Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Kaninchen (P3YEB,

Verdünnung 1:2000) [SCHEMANN et al. 1993].

- Anti-Cholinacetyltransferase aus Ziegen (Verdünnung: 1:100) (Chemicon, Temecula, USA). Für diesen primären Antikörper wurde nicht mit Ziegenserum präinkubiert, sondern mit 4 % Pferdeserum (Sigma)
  - Anti-Substanz P (SP), ein monoklonaler Antikörper aus Ratten (Verdünnung: 1:1000) (Fitzgerald, Acton, USA).
  - Anti-Neuropeptid Y aus Frettchen (NPY) (von Dr. D. Grundy, Sheffield, Grossbritannien [PFANNKUCHE et al. 1998b]).
  - Anti-Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) aus Kaninchen (Verdünnung 1:500) (Affinity, Nottingham, Grossbritannien).
- Maximal waren vierfach-Färbungen möglich. Da ein Farbstoff schon für die Darstellung der Neurobiotin-markierten Neurone verwendet wurde, konnten noch drei neuronale Marker gefärbt werden. Ein Teil der Präparate wurde für die Kombination ChAT / DBH / SP (mit Anti-ChAT aus Ziege und Anti-DBH aus Kaninchen) gefärbt, die anderen für ChAT / SP / NPY (mit Anti-ChAT aus Kaninchen).
  - Waschen in PBS (dreimal je 10 min).
  - Inkubation mit den sekundären Antikörpern in Phosphatpuffer. Zur Markierung der Neurobiotin-gefüllten Neurone wurde der Inkubationslösung noch Streptavidin - Carboxymethylindocyanin (Strep Cy3), (Verdünnung 1:7000), (Dianova, Hamburg) zugegeben.
  - Als sekundäre Antikörper wurden artspezifische Antikörper aus Ziegen bzw. Esel verwendet:
    - Anti-Kaninchen oder Anti-Ziege, konjugiert mit Indodicarbocyanin (Cy5) (Verdünnung: 1:500), (Dianova).
    - Anti-Kaninchen, konjugiert mit Dichlortriazinyl- Aminofluorescein (DTAF) (Verdünnung: 1:200) (Dianova).
    - Anti-Ratte, konjugiert mit 7-Amino-4-Methylcumarin-3-Essigsäure (AMCA) (Verdünnung: 1:50) (Dianova).
    - Anti-Frettchen, konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) (Verdünnung: 1:30) (Dianova).
  - Waschen in Phosphatpuffer (dreimal je 10 min)

- Eindeckeln auf Poly-l-Lysin beschichteten Objektträgern. Als Eindeckelmedium wurde Citifluor AF 1 (Citifluor, Canterbury, England) benutzt, welches ein rasches Ausbleichen der Fluoreszenz verhinderte.

Einige Präparate wurden zusätzlich nach der NADPH-Diaphorase Methode gefärbt. Immunhistochemisch lassen sich NO-synthetisierende Neurone durch Antikörper gegen NOS und durch einen histochemischen Nachweis der NADPH-Diaphorase nachweisen. Beide Methoden markieren die gleichen Neurone [LINCOLN et al. 1992, SCHEMANN et al. 1995]. Da es sich nicht um eine immunhistochemische Färbung handelt, läßt sie sich auch noch anwenden, wenn die Möglichkeiten der Antikörperfärbungen schon ausgeschöpft sind.

Da diese Art der Färbung die Fluoreszenzfärbungen stark abschwächt, wurde sie jeweils erst nach photographischer Dokumentation der relevanten Ganglien durchgeführt. Die Präparate wurden vom Objektträger genommen und bei 37 °C in Phosphatpuffer (pH 8) inkubiert, der 0,05 mg/ml  $\beta$ -NADPH (Sigma), 0,1 mg/ml Nitroblau-Tetrazolium (Sigma) und 0,5 % Triton X-100 (Sigma) enthielt. In Abständen von einigen Minuten wurde das Voranschreiten der Färbung unter einem Präparationsmikroskop beobachtet. NADPH-Diaphorase-positive Neurone färben sich dabei intensiv blau. Nach ca. 30-120 min wurde die Reaktion durch Waschen mit Phosphatpuffer unterbrochen. Nach dieser Zeit war die Färbung deutlich und die Neurobiotin-gefüllten Neurone waren noch sichtbar. Die Präparate wurden wieder eingedekelt und die Färbung mit Hilfe des Mikroskopes im Durchlichtverfahren ausgewertet.

## 2.4 *In Vitro*-Motilitätsuntersuchungen

Die Präparation fand ähnlich statt wie für die Elektrophysiologie, allerdings wurde die Zirkulärmuskulatur intakt gelassen. Aus dem Bereich des Korpus wurde ein Streifen (ca. 5 x 10 mm) herausgeschnitten, so daß die langen Seiten des Streifens parallel zur Zirkulärmuskulatur verliefen. Die Enden des Streifens wurden mit Nylonfaden verknotet. Das Stück wurde dann in einem Organbad (50 ml) an einem Ende fixiert und am anderen Ende mit einem isometrischem Kraftaufnehmer (FSG-01, Experimetria, Budapest, Ungarn) verbunden. Das Organbad war mit erwärmter Krebslösung (37 °C) gefüllt und ständig mit Carbogen begast. Das Gewebe wurde mit einer Kraft von 10 mN vorgespannt und konnte sich 90 min an die Versuchsbedingungen adaptieren. Die Registrierung der Kontraktionen erfolgte über eine Kombination aus Meßbrücke, Analog-Digital-Wandler (MacLab 4/e, AD Instruments, Australien) und Computer (Apple Macintosh Performa 475 mit Software Chart 3.5.1 von AD Instruments).

Während des Versuchs wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf den Basistonus oder das Verhalten des Gewebes unter elektrischer Feldstimulation untersucht. Zur Feldstimulation wurden zwei Elektroden aus Platindraht in unmittelbarer Nähe und parallel zum Gewebe plaziert. Sie konnten über eine Kombination aus Stimulator (A310 Accupulser, WPI) und Stimulationsisolator (A 385, WPI) angesteuert werden. Dabei wurden folgende Parameter benutzt: Strom 100 mA, Pulsbreite 0,5 ms, Frequenz 10 Hz, 100 Pulse.

## 2.5 Auswertung

Die gefärbten Gewebe wurden auf einem Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus, Hamburg) mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems ausgewertet. Dieses bestand aus einer Schwarz-Weiß-Videokamera (Mod. 4910, CoHU Inc., San Diego, USA), die mit einem Computer (Macintosh Power PC 8100/100) verbunden war und durch eine Bildanalyse-Software (IP-Lab Spectrum 3.0, Signal Analytics Corporation, Vienna, USA) gesteuert wurde. Da der Farbstoff Cy5 im Infrarot fluoresziert, wäre die Auswertung dieser Färbungen ohne dieses System unmöglich gewesen. Die Auswertung schwach gefärbter Axone wurde durch die Möglichkeit der Bildaddition und Kontrastverstärkung häufig erst möglich.

Die verwendeten Filterkombinationen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die

Tabelle 2.2: Fluoreszenzfilter

Filterblock	Dichroitischer			Farbstoff
	Anregungsfilter	Strahlteiler	Emissionsfilter	
UM41007	HQ545/30x	565DCLP	HQ610/75M	Cy3 (orange-rot)
U-MNIBA	BP 470-490	DM505	D520	FITC/DTAF (grün)
U-MWU	BP 330-385	DM400	BP 460-490	AMCA (blau)
U-M41008	HQ 620/60	Q660 LP	HQ 700/75	Cy5 (infrarot)

*Alle Angaben zu den Filtern stammen aus Unterlagen der Firma Olympus, Hamburg bzw. Chroma Technology, Brattleboro, USA.*

Färbungen einer Neurobiotin-gefüllten Zelle wurde durch Aufnahmen protokolliert.

Aus früheren Studien war bekannt, daß die Neurone im myenterischen Plexus des Magens unipolar sind [SCHEMANN und SCHAAF 1995]. Es wird angenommen, daß es sich bei dem langen Fortsatz aus dem Zellkörper um das Axon handelt. In sehr wenigen Fällen spaltet sich das Axon in seinem Verlauf und bildet Kollaterale. Ausgehend vom Zellkörper wurde der Verlauf des Axons mit

Hilfe eines digitalisierten Kreuztisches (Märzheuser, Wetzlar) soweit als möglich verfolgt. Dabei konnten mehrere Fälle auftreten:

- Das Axons war unbeschädigt und konnte bis zum Ende verfolgt werden. Je nach Zielgewebe war das zugehörige Neuron damit funktionell charakterisiert. Der Eintrittsort des Axons in das Zielgewebe wurde relativ zu seinem Zellkörper bestimmt. Daraus wurden Projektionsrichtung und -länge errechnet.
- Das Axon konnte bis zu einem Punkt verfolgt werden, an dem es durch die Zirkulärmuskulatur projizierte. Ein weiterer Verlauf über die Zirkulärmuskulatur hinaus in Richtung der abpräparierten Mukosa war erkennbar. Das Neuron wurde als zur Mukosa projizierendes Neuron charakterisiert. Projektionsrichtung und -länge konnten wie oben bestimmt werden.
- Das Axon endete unbeschädigt in einem Umkreis von weniger als 0,1 mm vom Zellkörper. Das Neuron wurde als lokal projizierend eingestuft.
- Sehr wenige Axone projizierten in einem Umkreis von 0,1 mm in Richtung der abpräparierten Zirkulärmuskulatur. Sie wurden als lokale Neurone mit Projektion zur Zirkulärmuskulatur oder Mukosa bezeichnet.
- Eine schwache Färbung oder Beschädigung verhinderten die Bewertung des Axonverlaufs. Eine funktionelle Charakterisierung war nicht möglich. Die Koordinaten des sichtbaren Axonendes relativ zum Zellkörper wurden aufgenommen und die Mindestprojektionslänge berechnet. Da die Axone eine einmal eingeschlagene Vorzugsrichtung nach Durchqueren eines Ganglions beibehalten, war zumindest eine Bestimmung der Projektionsrichtung möglich.
- Das Axon endete durch eine Beschädigung in der Nähe seines Zellkörpers, bevor es ein weiteres Ganglion durchquert hatte. Weder der funktionelle Typ noch die Projektionsrichtung konnten bestimmt werden.

Nach dem, von den Axonen innerviertem Zielgewebe wurden drei Funktionsklassen von Neuronen unterschieden:

**Interneurone** Das Axon verlief vollständig in der Ebene des Plexus und endete ohne Beschädigung innerhalb eines Ganglions.

**Motorneurone** Das Axon verließ die Plexusebene und zeigte entweder Enden innerhalb der Longitudinalmuskulatur (Longitudinalmuskelneurone) oder

verlief in der Zirkulärmuskulatur und endete dort (Zirkulärmuskelneurone). Mukosaneurone (Sekretomotorneurone) waren dadurch gekennzeichnet, daß sie noch über die Ebene der Zirkulärmuskulatur hinaus projizierten. Es wurde nicht beobachtet, daß Axone, die die Plexusebene verlassen hatten, dorthin zurückkehrten. Bei Neuronen, deren Axone in Richtung der Ebene der Zirkulärmuskulatur projizierten, die aber oberhalb des Plexus abgerissen waren, wurde daher geschlossen, daß sie entweder zur Zirkulärmuskulatur oder zur Mukosa projizierten.

**multifunktionelle Neurone** Das Axon spaltete sich in seinem Verlauf und bildete Kollaterale, die verschiedene Zielgewebe innervierten. Diese Neurone wurden als multifunktionell bezeichnet, obwohl ein funktioneller Beweis dieser Eigenschaft noch nicht erbracht werden konnte.

Axone, die durch das Entfernen der Zirkulärmuskulatur beschädigt werden, weisen normalerweise eine blasenförmige Verdickung auf (*Expansionsbulbus*), die durch Anreicherung von Neurobiotin zustande kommt. Ein solches Merkmal wird als Indiz für eine Projektion des Axons zur Zirkulärmuskulatur oder zur Mukosa angesehen [SCHEMANN und SCHAAF 1995]. Ähnliche Strukturen wurden in den hier durchgeführten Versuchen nur selten angetroffen. Dies wurde wahrscheinlich durch die Behandlung der Präparate mit Colchicin bewirkt. Es hemmt den axonalen Transport und verhindert damit wahrscheinlich auch eine Anreicherung von Neurobiotin am beschädigten Ende des Axons.

## 2.6 Statistik

Da die meisten Daten auf Nominal- bzw. Ordinalniveau vorlagen, wurden zu meist parameterfreie Tests benutzt. Für den Vergleich von Häufigkeiten in verschiedenen Klassen wurde der  $\chi^2$ -Test angewendet (bei 2x2-Tabellen mit Anwendung des Yates-Korrekturfaktors). Bei zu kleinen Häufigkeiten in den Klassen (kleiner als 5 in einer oder mehr Klassen) wurde der Fisher-Test benutzt. Für den Vergleich von Membranpotentialen in verschiedenen Klassen wurde zunächst mit einem Anpassungstest nach Kolmogorov-Smirnov auf Normalverteilung geprüft. Da meist keine Normalverteilung vorlag, wurden Membranpotentiale mit einem Rangsummentest nach Mann-Whitney verglichen. Projektionslängen bzw. Abstände wurden mit dem t-Test verglichen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Tests auf einem Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  durchgeführt.

## 2.7 Lösungen

Die Chemikalien wurden von Sigma GmbH, Steinheim bezogen, soweit nicht anders angegeben.

**Krebslösung** In mMol/l:  $\text{MgCl}_2$ : 1,2 /  $\text{CaCl}_2$ : 2,5 /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 1,2 /  $\text{NaCl}$ : 117 /  $\text{NaHCO}_3$ : 25 /  $\text{KCl}$ : 4,7 / Glucose: 11. Alle Chemikalien 'Zellkulturgetestet'. Die Lösung wurde zur Einstellung des pH Wertes auf 7,4 vor und während der Versuche mit Carbogen begast.

**Phosphatpuffer** 0,1 M in Aqua bidest., auf pH 7,44 eingestellt.

**Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)** 0,1 M Phosphatpuffer mit 0,88 %  $\text{NaCl}$ . Zur Lagerung von Geweben zusätzlich mit 0,1 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ).

**Fixierlösung** 4 % Paraformaldehyd und 0,2 % Pikrinsäure in Phosphatpuffer.

**Kulturmedium** 'Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham' mit Zusatz von 2,1g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 10 % hitzeinaktiviertem Kälberserum (CCpro, Neustadt), 100 IU/ml Penicilin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2,75  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B und 50 $\mu\text{g}$  Gentamycin. Auf pH 7,4 eingestellt.

**Colchicin** Als Zusatz zum Zellkulturmedium. Stammlösung 40 mM in Aqua bidest. Endkonzentration 60  $\mu\text{M}$ .

**Nifedipin** Stammlösung: 10 mM in Äthanol p.A.. Endkonzentration 1  $\mu\text{M}$ .

**Kaliumchloridlösung** Für intrazelluläre Elektroden: 0,5 M in Aqua bidest., mit Kaliumacetatlösung auf pH 7,25 eingestellt.

**Neurobiotin** Endkonzentration 0,5 % in sterilfiltrierter Kaliumchloridlösung für Elektroden (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Die Lösung wurde in Aliquots von 10  $\mu\text{l}$  bei -20 °C aufbewahrt.

**Fast Green** Für Spritzpipetten. Stammlösung: 10 mM in 0,9 %  $\text{NaCl}$ -Lösung. Spritzenkonzentration 0,5 mM.

**Noradrenalin** Für Spritzpipetten. Stammlösung: 10 mM in Krebslösung, Spritzenkonzentration: 0,1 mM.

**Serotonin** Für Spritzpipetten. Stammlösung: 10 mM in 0,9 %  $\text{NaCl}$ -Lösung, Spritzenkonzentration: 1 mM.

**Glycin** Für Spritzpipetten. Stammlösung: 10 mM in Krebslösung. Die Stammlösung mußte nach dem Ansetzen einige Minuten mit Carbogen begast werden, um ein Ausfallen von CaCl aus der Krebslösung zu verhindern. Spritzenkonzentration: 1 mM.

**Acetylcholin** Für Spritzpipetten. Stammlösung: 10 mM in Aqua bidest., Spritzenkonzentration: 0,5 mM.

**ICS-205-930** Zur Perfusion bei elektrophysiologischen Versuchen: 0,1  $\mu$ M in Krebslösung. Für Spritzpipetten: Stammlösung: 10 mM in Aqua bidest., Spritzenkonzentration: 2 mM (Sandoz, Basel, Schweiz).

**N-Acetyl-5-Hydroxytryptophyl-5-Hydroxytryptophan Amid (5-HTP-DP)**

Zur Perfusion bei elektrophysiologischen Versuchen: Stammlösung: 10 mM in Ethanol, Endkonzentration: 10  $\mu$ M. Für Motilitätsmessungen: Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M (Kali Chemie, Hannover).

**Nitroprussid-Natrium-Dihydrat** Zur Perfusion bei elektrophysiologischen Versuchen: 1 mM in Krebslösung (Merck, Darmstadt).

**Strychnin** Zur Perfusion bei elektrophysiologischen Versuchen: Stammlösung: 3 mM in Aqua bidest., Endkonzentration: 0,3  $\mu$ M.

**Furosemid** Zur Perfusion bei elektrophysiologischen Versuchen: Endkonzentration: 1 mM (Furosemid-ratiopharm 20).

**5-Hydroxyindalpin (5-OHIP)** Für Motilitätsmessungen. Stammlösung: 5 mM in Aqua bidest., Endkonzentrationen: 0,1  $\mu$ M bis 100  $\mu$ M (Kali Chemie, Hannover).

**2-methyl-5-HT** Für Motilitätsmessungen. Stammlösung: 10 mM in Aqua bidest., Endkonzentrationen: 1  $\mu$ M bis 40  $\mu$ M (Sandoz, Basel, Schweiz).

**Atropin** Für Motilitätsmessungen. Endkonzentration: 0,5  $\mu$ M.

**Hexamethonium** Für Motilitätsmessungen. Stammlösung: 0,1 M in Aqua bidest., Endkonzentration: 200  $\mu$ M.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Elektrophysiologie

Bei 454 Neuronen konnte das Membranpotential gemessen werden und die Erregbarkeit (siehe Seite 12, Abbildungen 3.2, 3.3) festgestellt werden. Da die Membranpotentiale der verschiedenen Zelltypen nicht normalverteilt waren, wurden sie mit einem Rangtest verglichen. Die Membranpotentiale von Gastric-I, Gastric-II und Gastric-III Neurone unterschieden sich signifikant voneinander. Zum Vergleich mit Literaturdaten sind in Tabelle 3.1 auch Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Bei 286 Neuronen konnten durch Stimula-

Tabelle 3.1: Membranpotentiale von Gastric-I,-II und -III Neuronen

	Gastric-I	Gastric-II	Gastric-III
Anteil [%]	51,7	45,6	2,6
Membranpotential: Median [mV]	-45	-50	-62
Quantile	-49/-42	-53/-45	-66,5/-58,5
Membranpotential: Mittelwert [mV]	-46,0	-49,7	-61,9
Standardabweichung	5,1	6,4	6,5

*Membranpotential und elektrische Erregbarkeit konnten bei 454 Zellen bestimmt werden. Die Membranpotentiale von Gastric-I, -II und -III Neuronen unterschieden sich signifikant (Mann-Whitney Rangsummentest).*

tion eines interganglionären Faserstranges fEPSP's, meist gefolgt von einem Aktionspotential, ausgelöst werden. Es wurde kein Neuron gefunden, das nicht durch mindestens einen Faserstrang stimulierbar war. Bei insgesamt 47 Neuronen wurden über eine extrazelluläre Elektrode Pulsfolgen gegeben. In der Hälfte

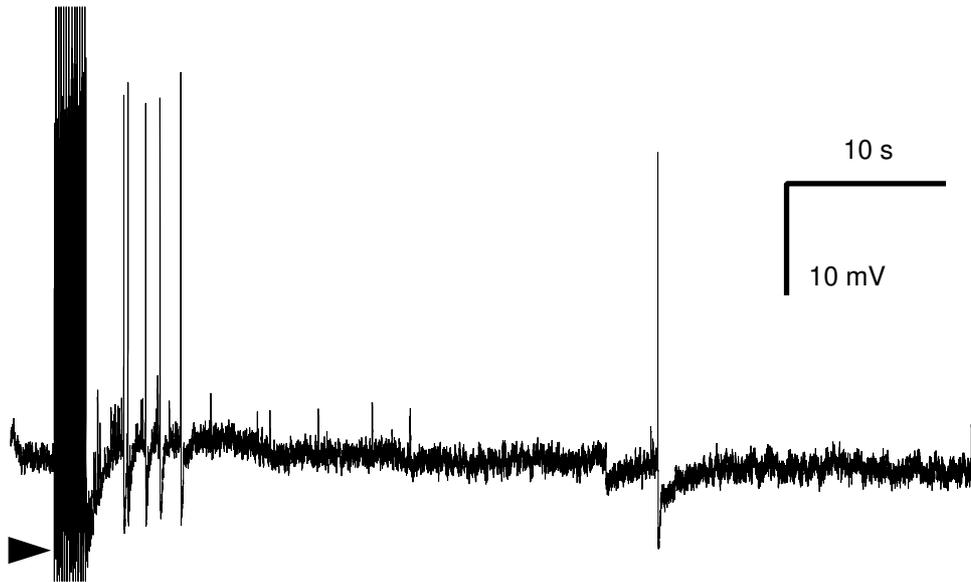


Abbildung 3.1: Neuron mit langsamer erregender Antwort (sEPSP) nach der Applikation einer Pulsfolge (2 s, 20 Hz) (Pfeilspitze) auf einen interganglionären Faserstrang. Die senkrechten Linien bei der Gabe der Pulsfolge stelle Stimulationsartefakte dar..

der Fälle konnte damit eine langsame erregende Antwort (sEPSP) (siehe Abb. 3.1) ausgelöst werden. Neurone mit bzw. ohne sEPSP unterschieden sich in ihrer elektrischen Erregbarkeit: Von den Neuronen ohne sEPSP waren 30 % vom Typ Gastric-I (7 von 23), 65 % vom Typ Gastric-II (15 von 23) und eines vom Typ Gastric-III. In der Gruppe von Neuronen mit sEPSP waren 74 % Gastric-I (17 von 24) und 26 % Gastric-II (7 von 24). Damit waren Neurone mit sEPSP signifikant häufiger tonisch-erregbar als Neurone ohne sEPSP. Eine Stimulation durch den N. Vagus war bei 170 von 210 Neuronen (81 %) erfolgreich, während sich bei 40 von 210 Neuronen (19 %) keine Reaktion auslösen ließ. Neurone mit und ohne synaptischen Kontakt zum N. Vagus unterschieden sich voneinander nur durch ihre Lage auf dem Präparat: Neurone mit Kontakt lagen signifikant näher an der kleinen Krümmung als Neurone ohne Kontakt zum N. Vagus (Abstände vom Ösophagus sphinkter: mit Kontakt:  $8,9 \pm 3,1$  mm  $n=113$ ; ohne Kontakt  $10,3 \pm 4,1$  mm  $n=27$ . Jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Da die Zahl der Gastric-III Neurone nur sehr klein war, wurden für die statistischen Vergleiche im folgenden nur die Zahlen für Gastric-I und Gastric-II Neurone herangezogen.

### 3.2 Neurochemischer Code

Wie in der Einleitung dargelegt, lassen sich die Neurone des myenterischen Plexus nach ihrem neurochemischen Code in Gruppen einteilen. Die zwei Hauptgruppen werden von den cholinergen und den nitroxidergen (Stickoxidsynthetisierenden) Neuronen gebildet. Sie stellen zusammen mindestens 99 % aller Neurone im myenterischen Plexus des Meerschweinchenmagens dar [SCHEMANN et al. 1995]. Mit der Färbung auf ChAT läßt sich daher praktisch der gesamte myenterische Plexus als entweder ChAT-positiv, also cholinerg, oder ChAT-negativ, d.h. nitroxiderg, darstellen. Aus diesem Grund werden im folgenden ChAT-negative Neurone als NOS-positiv bezeichnet, obwohl keine Färbungen auf NOS durchgeführt wurden. Die Antikörperkombinationen bei den Mehrfachfärbungen für diese Arbeit wurden gewählt, um einige Untergruppen dieser beiden Populationen analysieren zu können. Es wurden Färbungen für die Kombinationen ChAT/SP/DBH sowie ChAT/SP/NPY durchgeführt. Die damit zu unterscheidenden neurochemischen Codes sind in Tabelle 2.1 (S. 15) angegeben. Sowohl positive als auch negative Färbungen konnten Aufschluß über den neurochemischen Code eines Neurons geben.

Die Anteile von Neuronen mit mindestens einem der vier untersuchten Marker sind in Tabelle 3.2 angegeben. Dort und im folgenden sind Neurone, die einen bestimmten Marker enthalten bzw. nicht enthalten mit  $\oplus$  bzw. mit  $\ominus$  gekennzeichnet. ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$  bezeichnet z.B. eine Zelle in der ChAT und SP nachgewiesen wurde, ChAT $\oplus$ / $\ominus$  eine Zelle in der nur ChAT und sonst keiner der getesteten Marker vorhanden war. Kolokalisation von SP und NPY wurde

Tabelle 3.2: Neuronale Marker in den gefärbten Neuronen

	Anteil [%]	n	N
ChAT $\oplus$	67	157	235
SP $\oplus$	22	55	250
NPY $\oplus$	44	60	137
DBH $\oplus$	10	20	196

*N: Zahl der Neurone die für einen Marker gefärbt wurden, n Zahl der positiven Neurone, Kolokalisation mehrerer Marker war möglich.*

nicht beobachtet (N=90), Kolokalisation von SP und DBH in einem von 128 Fällen. ChAT und DBH waren in 4 von 80 Neuronen kolokalisiert, DBH kam in NOS $\oplus$  Neuronen nicht vor (0 von 80). Die Transmitterkombinationen in Tabelle 3.3 stammen aus einander ausschließenden Neuronenpopulationen, die die Gesamtheit der Neurone darstellen [SCHEMANN et al. 1995]. Diskrepanzen

Tabelle 3.3: Kolokalisationen von neuronalen Markern in ChAT $\oplus$  und NOS $\oplus$  Neuronen

	Anteil [%]	n	N
ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$	24	39	162
ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$	19	24	125
ChAT $\oplus$ /SP $\ominus$ /NPY $\ominus$	26	22	85
NOS $\oplus$ /SP $\oplus$	1	2	162
NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$	24	30	125
NOS $\oplus$ /SP $\ominus$ /NPY $\ominus$	6	5	85

*N*: Gesamtzahl der Neurone die für eine bestimmte Transmitterkombination gefärbt wurden, *n* Zahl der Neurone mit der angegebenen Transmitterkombination. Die Prozentzahlen beziehen sich immer auf die Gesamtpopulation aller Neurone. Weitere Kombinationen siehe Text.

zwischen den Tabellen 3.2 und 3.3 lassen sich daraus erklären, daß nicht alle Färbungen an allen Geweben zugleich durchgeführt werden konnten.

DBH ist im Korpus des Meerschweinchenmagens immer mit ChAT und NPY kolokalisiert [SCHEMANN et al. 1995]. Da zwischen der DBH $\oplus$ -Gruppe und der ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Gruppe keine statistischen Unterschiede bestanden, wurden im folgenden beide Gruppen als ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$  zusammengefaßt.

### 3.2.1 Erregbarkeit und neurochemischer Code

Die Gesamtheit der NOS $\oplus$ -Neurone und deren Untergruppen (NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$ , NOS $\oplus$ / $\ominus$ ) waren mehrheitlich vom Typ Gastric-I (Tabelle 3.4). Sie unterschieden sich signifikant von der Gesamtpopulation sowie von allen Untergruppen der ChAT $\oplus$  Neurone. Die Gesamtheit der ChAT $\oplus$  Neurone zeigte keine Unterschiede zur Gesamtheit aller Neurone. Nur die Untergruppe ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$  hatte signifikant mehr Neurone vom Typ Gastric-II als alle anderen identifizierten neurochemischen Gruppen. Bei 28 Neuronen die auf das Auftreten von sEPSP's hin untersucht wurden, wurde eine ChAT-Färbung durchgeführt. Von 13 Neuronen ohne sEPSP waren 11 ChAT $\oplus$  und 2 NOS $\oplus$ . Bei den Neuronen mit sEPSP waren 9 ChAT $\oplus$  und 6 NOS $\oplus$ . Der Unterschied war statistisch nicht signifikant. Neurone mit bzw. ohne Reaktion nach Stimulation des N. Vagus zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Zahlen für ChAT $\oplus$  bzw. NOS $\oplus$ -Neurone (mit Reaktion: 57 ChAT $\oplus$ , 33 NOS $\oplus$ ; ohne Reaktion: 15 ChAT $\oplus$ , 2 NOS $\oplus$ ).

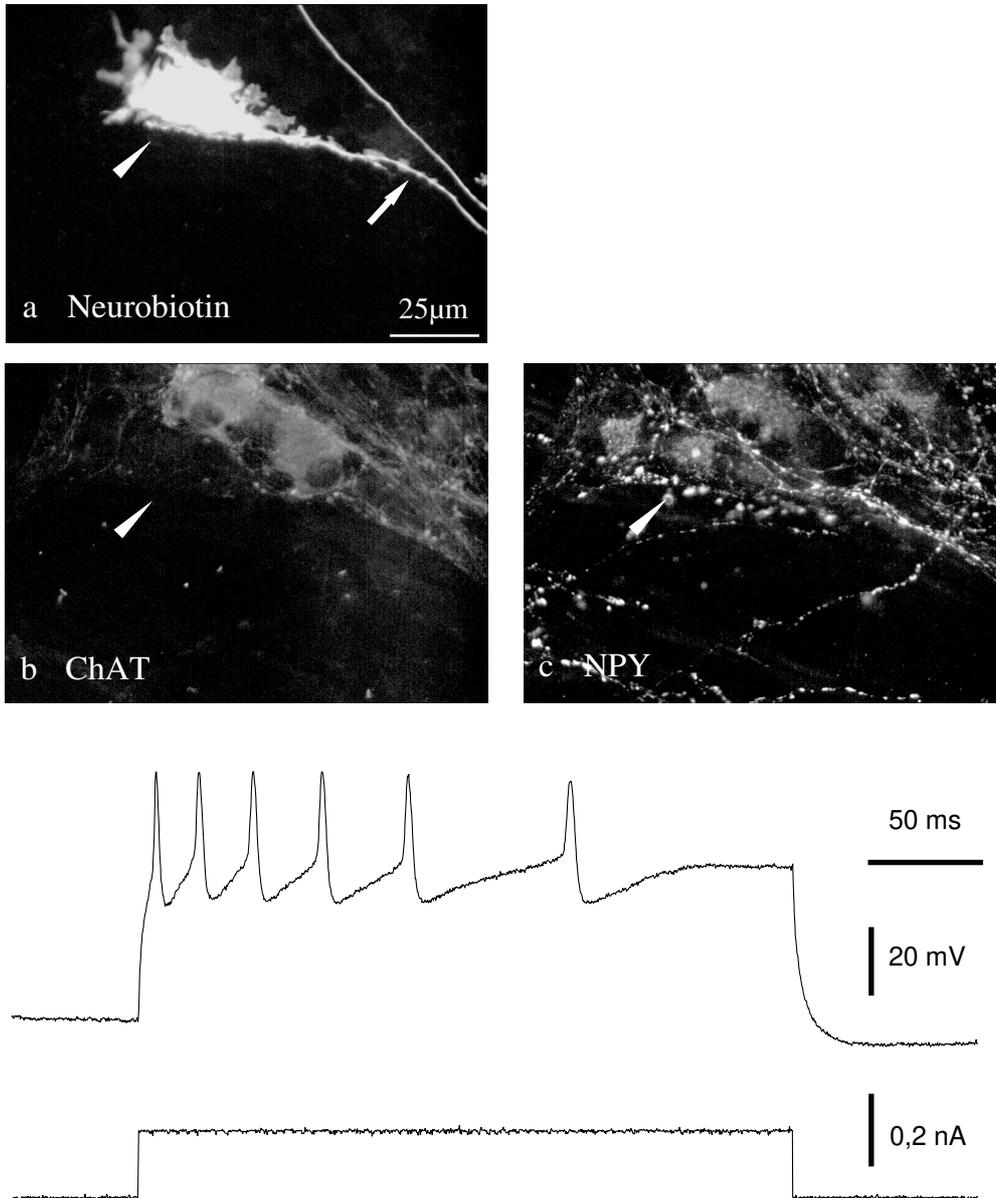


Abbildung 3.2: Gastric-I Neurone sind vorwiegend  $\text{NOS}^{\oplus}/\text{NPY}^{\oplus}$ -codiert und projizieren in anale Richtung. Im oberen Teil sind immunhistochemische Aufnahmen eines Gastric-I Neurons zu sehen. Der Zellkörper ist jeweils durch eine Pfeilspitze markiert, das Axon in (a) durch einen Pfeil. Das zweite, im oberen rechten Teil von (a) verlaufende Axon stammte von einem zweiten, im selben Ganglion angestochenen Neuron. Da das Neuron nicht immunreaktiv für ChAT ist, muß es  $\text{NOS}^{\oplus}$  sein (b). Es ist gleichzeitig  $\text{NPY}^{\oplus}$  (c). Im unteren Teil ist die Reaktion des Neurons auf die Injektion eines depolarisierenden Strompulses gezeigt. Das Neuron entlädt mehrere Aktionspotentiale während des Strompulses und ist daher vom Typ Gastric-I.

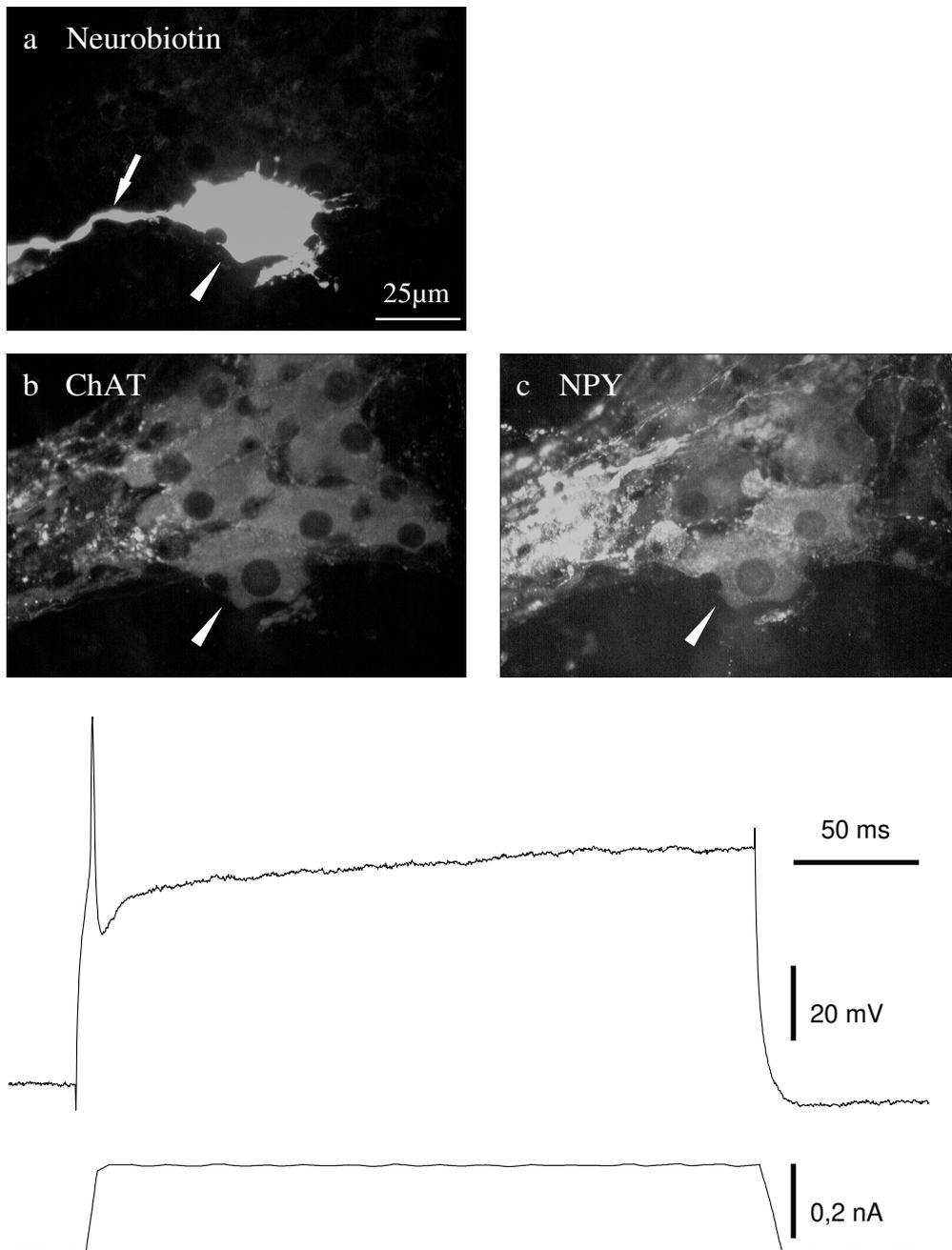


Abbildung 3.3: Gastric-II Neurone sind vorwiegend  $\text{ChAT}^{\oplus}/\text{NPY}^{\oplus}$ -codiert und projizieren in orale Richtung. Im oberen Teil sind immunhistochemische Aufnahmen eines Gastric-II Neurons zu sehen. Der Zellkörper ist jeweils durch eine Pfeilspitze markiert, das Axon in (a) durch einen Pfeil. Das Neuron ist  $\text{ChAT}^{\oplus}$  (b) und  $\text{NPY}^{\oplus}$  (c). Im unteren Teil ist die Reaktion des Neurons auf die Injektion eines depolarisierenden Strompulses gezeigt. Es entlädt nur ein einzelnes Aktionspotential zu Beginn des Strompulses und ist daher vom Typ Gastric-II.

Tabelle 3.4: Elektrische Erregbarkeit und neurochemischer Code

	Gastric-I [%]	Gastric-II [%]	N
alle Neurone	53	47	442
alle ChAT $\oplus$	47	53	144
ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$	24	76	37
ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$	60	40	35
ChAT $\oplus$ / $\ominus$	37	63	19
alle NOS $\oplus$	81	19	67
NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$	92	8	25
NOS $\oplus$ / $\ominus$	60	40	5

*N*: Zahl der Neurone, bei denen neurochemischer Code und elektrische Erregbarkeit bestimmt werden konnte. Die NOS $\oplus$  Populationen waren signifikant häufiger vom Typ Gastric-I als alle Neurone und als die ChAT $\oplus$  Populationen. Die Gruppe der ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Neurone war signifikant häufiger vom Typ Gastric-II als alle anderen neurochemischen Gruppen.

### 3.3 Projektion der Axone

Die Projektionsrichtungen der Neurobiotin-gefüllten Axone zeigten eine deutliche Polarisierung in longitudinaler Richtung. Für die meisten Auswertungen wurde daher nur zwischen oral projizierenden (ascendierenden), anal projizierenden (descendierenden) und lokalen Neuronen unterschieden. Bei 324 Neuronen konnte die Projektionsrichtung ermittelt werden. Von diesen waren 56 % (182) oral, 37 % (121) anal und 7 % (21) lokal projizierend. Die Zahl der ascendierenden Neurone war im Vergleich zu einer angenommenen Gleichverteilung signifikant größer als die Zahl der descendierenden Neurone. Bei einer Aufteilung der Projektionsrichtungen in vier Quadranten zeigte sich, daß in Richtung anal/kleine Krümmung signifikant weniger Neurone projizierten als in die anderen drei Richtungen (oral/große Krümmung 31 % (90), oral/kleine Krümmung 30 % (87), anal/kleine Krümmung 14 % (41), anal/große Krümmung 25 % (74)). Dabei wurde mit einem  $\chi^2$ -Test gegen eine Gleichverteilung auf die vier Quadranten getestet. Die Projektionslängen der Axone betrugen für ascendierende Neurone  $1,4 \pm 1,2$  mm und für descendierende Neurone  $1,7 \pm 1,6$  mm (jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

### 3.3.1 Erregbarkeit, neurochemischer Code und Projektion der Neurone

Oral projizierende Neurone waren etwa zu gleichen Teilen vom Typ Gastric-I bzw. vom Typ Gastric-II (Gastric-I: 49 %, Gastric-II: 51 %, N=155), während in der Gruppe der anal projizierenden Neurone signifikant mehr Gastric-I Neurone vorhanden waren (Gastric-I: 64 %, Gastric-II: 36 %, N=103).

In der Gruppe der Neurone mit ascendierender Projektion gab es 10 mit sEPSP und 8 ohne, in der Gruppe mit descendierender Projektion waren 6 mit und 2 ohne sEPSP. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

Der Vergleich von neurochemischem Code und Projektion der Neurone zeigte deutliche Unterschiede zwischen ChAT $\oplus$  und NOS $\oplus$  Neuronen. ChAT $\oplus$  Neurone projizierten signifikant häufiger in orale Richtung als NOS $\oplus$  Neurone. Dies galt auch für die jeweiligen Untergruppen. Beim Vergleich der ChAT $\oplus$  Unterpopulationen zeigte sich, daß die ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$  Neurone signifikant häufiger in orale Richtung projizierten als alle ChAT $\oplus$  Neurone und als die ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$  Neurone (Tabelle 3.5). Weitere signifikante Unterschiede zwischen Untergruppen der ChAT $\oplus$  Neurone waren nicht zu ermitteln.

In der Gruppe der NOS $\oplus$  Neurone projizierten die NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$  Neurone signifikant häufiger in anale Richtung als die Gesamtpopulation der NOS $\oplus$  Neurone und die Gruppe der NOS $\oplus$ / $\ominus$  Neurone (Tabelle 3.5). Neurone mit bzw. ohne Reaktion nach Stimulation des N. Vagus zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf ihre elektrische Erregbarkeit oder ihre Projektion (mit Reaktion: 83 Gastric-I, 83 Gastric-II; 69 asc., 45 desc., 11 lokal; ohne Reaktion: 24 Gastric-I, 17 Gastric-II; 17 asc., 8 desc., 4 lokal).

## 3.4 Funktion der Neurone

Normalerweise zeigten die Enden der Axone eine Struktur [SCHEMANN und SCHAAF 1995], die sie von beschädigten Axonen eindeutig unterschied. Eine relativ große Zahl von Axonen zeigte jedoch eine unvollständige Füllung des Axons, ohne daß Anzeichen einer Beschädigung sichtbar waren. Ursache war wahrscheinlich die durchgeführte Colchicinbehandlung. Diese war jedoch notwendig um den neurochemischen Code der Neurone zu bestimmen. Diesen Neuronen, und Neuronen deren Axone vor Erreichen ihres Zielgewebes beschädigt waren, konnte kein Innervationsgewebe zugeordnet werden (n=310).

Die verschiedenen Typen von Motorneuronen zeigten bei den meisten statistischen Vergleichen ein homogenes Erscheinungsbild und wurden daher als

Tabelle 3.5: Neurochemischer Code und Axonprojektion der Neurone

	Ascendierend [%]	Descendierend [%]	lokal [%]	N
alle ChAT $\oplus$	83	14	3	118
ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$	56	34	10	32
ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$	100	0	0	32
ChAT $\oplus$ / $\ominus$	75	17	8	12
alle NOS $\oplus$	34	66	0	65
NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$	4	96	0	23
NOS $\oplus$ / $\ominus$	50	50	0	12

*N: Zahl der Neurone, bei denen neurochemischer Code und Axonprojektion bestimmt werden konnten. Alle ChAT $\oplus$  Gruppen projizierten signifikant häufiger in orale Richtung als die NOS $\oplus$  Gruppen. ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$ -Neurone projizierten signifikant häufiger in orale Richtung als alle ChAT $\oplus$ -Neurone und als die ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Neurone. NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$  projizierten signifikant häufiger in analer Richtung als alle NOS $\oplus$  bzw. als die NOS $\oplus$ / $\ominus$ -Neurone.*

eine Gruppe behandelt. Die Ausnahmen, bei denen sich Longitudinalmuskel-, Zirkulärmuskel-, oder Mukosaneurone voneinander unterschieden, sind jedoch jeweils erwähnt. Insgesamt konnten 161 Neurone funktionell charakterisiert werden. 36 % (58) wurden als Interneurone klassifiziert, 53 % (86) als Motorneurone und 11 % (17) als multifunktionelle Neurone. Von den Motorneuronen projizierten 8 zur Longitudinalmuskulatur, 23 zur Zirkulärmuskulatur und 15 zur Mukosa. Bei 39 Motorneuronen konnte nicht entschieden werden, ob sie zur Zirkulärmuskulatur oder zur Mukosa projizierten, da das Axon vorher durch die Entfernung der Mukosa bzw. des Zirkulärmuskelstreifens abgerissen war. Motorneurone hatten signifikant größere Projektionsstrecken ( $2\pm 1,3$  mm) als Interneurone ( $1\pm 1,1$  mm). Die Axone der Motorneurone zur Zirkulärmuskulatur verliefen teilweise noch über mehrere Millimeter in der Muskulatur.

### 3.4.1 Funktion, Erregbarkeit, neurochemischer Code und Projektion der Neurone

Interneurone, multifunktionelle Neurone und Motorneurone unterschieden sich in ihrer elektrischen Erregbarkeit nicht signifikant (Interneurone: 31 Gastric-I, 23 Gastric-II, multifunktionelle Neurone: 8 Gastric-I, 8 Gastric-II, Motorneurone: 46 Gastric-I, 38 Gastric-II, ein einziges Gastric-III Neuron wurde als Motorneuron identifiziert). Neurone mit bzw. ohne sEPSP zeigten keine Unterschiede bezüglich ihrer Funktion.

Beim Vergleich von Funktion und neurochemischem Code zeigte sich, daß Interneurone signifikant häufiger ChAT $\oplus$  waren als Motorneurone. Auf der anderen Seite gehörten NOS $\oplus$  Neurone signifikant häufiger zur Gruppe der Motorneurone als zu einer der anderen funktionellen Gruppen. (Interneurone: 30 ChAT $\oplus$ , 6 NOS $\oplus$ , Motorneurone: 37 ChAT $\oplus$ , 23 NOS $\oplus$ , multifunktionelle Neurone: 5 ChAT $\oplus$ , 0 NOS $\oplus$ ). Von sechs Longitudinalmuskel-Motorneuronen war eins ChAT $\oplus$  und fünf NOS $\oplus$ , während bei Zirkulärmuskel-Motorneuronen zehn ChAT $\oplus$  und sieben NOS $\oplus$  gefunden wurden. Von elf Mukosaneuronen waren neun ChAT $\oplus$  und zwei NOS $\oplus$ . Damit unterschieden sich nur Longitudinal-Motorneurone und Mukosaneurone signifikant voneinander. Für die anderen Neurotransmitter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den Gesamtpopulationen bzw. zwischen den funktionellen Klassen.

Unter den funktionellen Gruppen und zur Gesamtheit der untersuchten Neurone ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Projektionsrichtung: Interneurone: 29 ascendierend, 22 descendierend, multifunktionelle Neurone: 9 asc., 6 desc., Motorneurone: 45 asc., 30 desc.. Bei einer Unterscheidung in ChAT $\oplus$ - und NOS $\oplus$ -Neurone projizierten die ChAT $\oplus$  Interneurone signifikant häufiger in anale Richtung als die ChAT $\oplus$  Muskelneurone (ChAT $\oplus$ : Interneurone: 17 asc., 8 desc., Motorneurone: 30 asc., 2 desc.), während sich zwischen den NOS $\oplus$  Gruppen keine Unterschiede ergaben (NOS $\oplus$ : Interneurone: 2 asc., 4 desc., Muskelneurone: 6 asc., 17 desc., keine NOS $\oplus$ -multifunktionellen Neurone nachgewiesen). In den Projektionslängen waren keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln. Auch Zellen mit bzw. ohne Antwort auf Stimulation des N. Vagus zeigten keine Unterschiede in der Zugehörigkeit zu den funktionellen Gruppen (mit Antwort: 23 Interneurone, 8 multifunktionelle Neurone, 35 Motorneurone; ohne Antwort: 7 Interneurone, 1 multifunktionelles Neuron, 8 Motorneurone).

## 3.5 Pharmakologie

### 3.5.1 Serotonin

#### Elektrophysiologie

Die Wirkung von Serotonin wurde durch Spritzapplikation bei insgesamt 257 Neuronen untersucht. Dabei wurden zwei durch unterschiedliche Rezeptoren vermittelte Arten von Antworten beobachtet. Die eine bestand aus einer schnellen und nur kurz dauernden Depolarisation, (Abbildung 3.7). In einigen Fällen kam es zu Beginn der Depolarisation zu einer Entladung von Aktionspotentialen. Die Antwort zeigte bei wiederholter Serotoninapplikation eine deutliche Desensibilisierung (Abbildung 3.5). Diese Eigenschaften sind charakteristisch für eine durch den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte Antwort [SCHEMANN 1991a]. Die Antwort wurde durch Perfusion mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten ICS - 205 - 930 (Tropisetron, 3-Tropanyl-Indol-3-Carboxylat-Metiodid) vollständig blockiert (n=2). Die Neurone konnten jedoch nicht lange genug gehalten werden, um ein Auswaschen des Antagonisten zu erreichen. Spritzapplikation des Antagonisten blockierte die 5-HT<sub>3</sub> Antwort fast vollständig (n=6). Die Antwort kehrte nach einer Auswaschperiode von wenigen Minuten zurück (Abbildung 3.4). Die 5-HT<sub>3</sub>-Antwort trat bei 58 % der untersuchten Neurone auf. Bei 55 Neuronen wurden Dauer und Amplitude der Antwort ausgewertet: Die Dauer betrug durchschnittlich  $4 \pm 2,8$  s, die kürzeste Antwort dauerte 1,8 s, die längste 7 s. Die Amplitude betrug durchschnittlich  $12,3 \pm 6,1$  mV mit einem Bereich von 8 mV bis 30 mV (jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Die andere Antwort nach Applikation von Serotonin bestand aus einer langsam einsetzenden und länger anhaltenden Depolarisation. Diese war mit einer verstärkten Erregbarkeit des Neurons verbunden, die über einen großen Teil der Depolarisation anhielt (Abbildung 3.6). Diese Antwort wird durch den 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor vermittelt [MAWE et al. 1986]. Der 5-HT<sub>1P</sub>-Antagonist 5-HTP-DP (N-Acetyl-5-Hydroxytryptophyl-5-Hydroxytryptophan Amid, 5-HTP-DP) bewirkte bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M eine Verminderung der Serotonin-induzierten Aktionspotentiale.

Diese Antwort wurde bei 16 % der untersuchten Neurone gefunden. Für 12 ausgewertete Neurone betrug die Dauer durchschnittlich  $80 \pm 33$  s (Bereich 42 s bis 90 s) und die maximale Amplitude  $5,7 \pm 3,1$  mV (Bereich 4 mV bis 18 mV).

Ein Anteil von 3 % der untersuchten Neurone zeigte ein Auftreten beider Antworten und 23 % der Neurone zeigten keine Antworten nach Applikation von Serotonin.

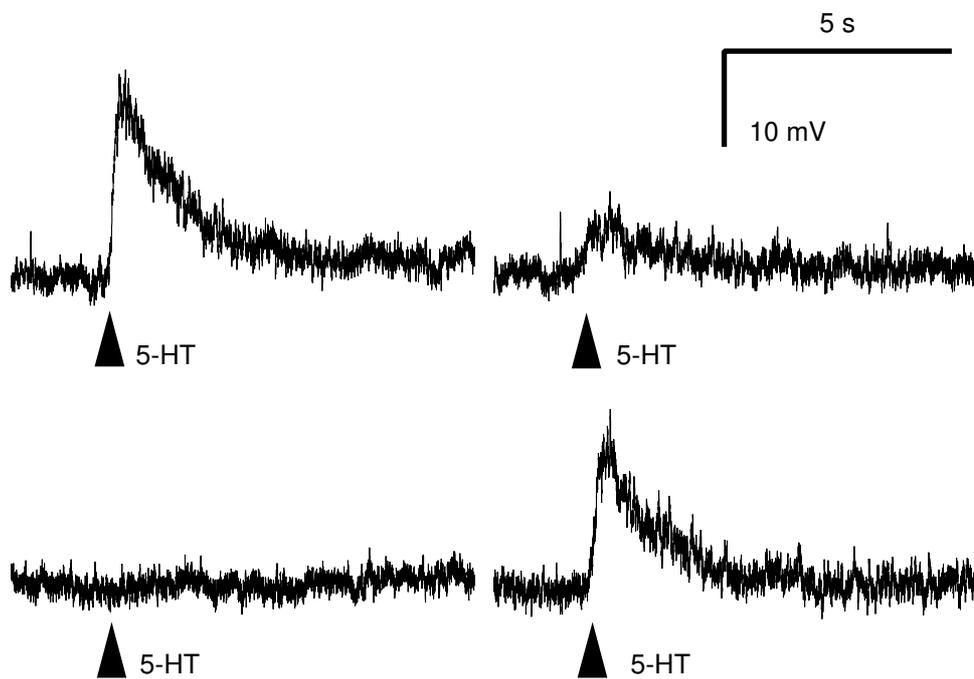


Abbildung 3.4: Spritzapplikation des  $5\text{-HT}_3$ -Antagonisten ICS-205-930 hemmt eine  $5\text{-HT}_3$ -Antwort. Spritzapplikation von Serotonin (400 ms) ist jeweils durch eine Pfeilspitze angedeutet. Links oben ist eine Kontrollantwort gezeigt, darunter die Hemmung der Antwort 80 s nach einer Spritzapplikation von ICS-205-930 (15 s). Die Antwort ist auch nach 210 s noch teilweise gehemmt (rechts oben) und kehrt erst 670 s vollständig zurück (rechts unten).

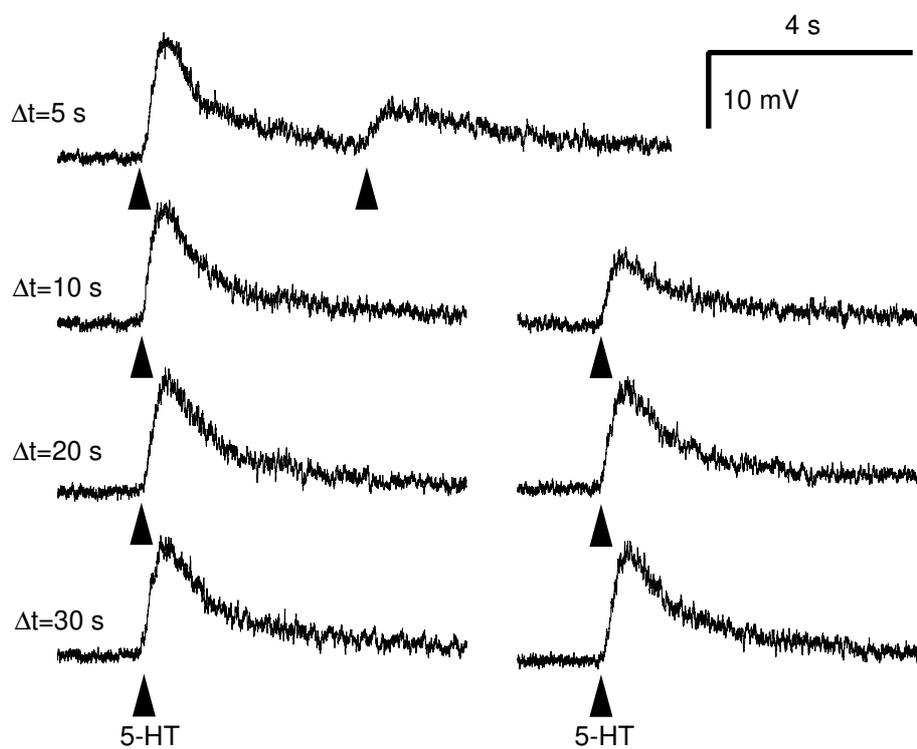


Abbildung 3.5: Die  $5\text{-HT}_3$ -Antwort zeigt Desensibilisierung bei wiederholter Gabe von Serotonin. Bei einem Neuron wurde jeweils zweimal Serotonin gespritzt (je 200 ms) (Pfeilspitzen), erst bei einem Zeitintervall von 30 s waren beide Antworten gleich groß.

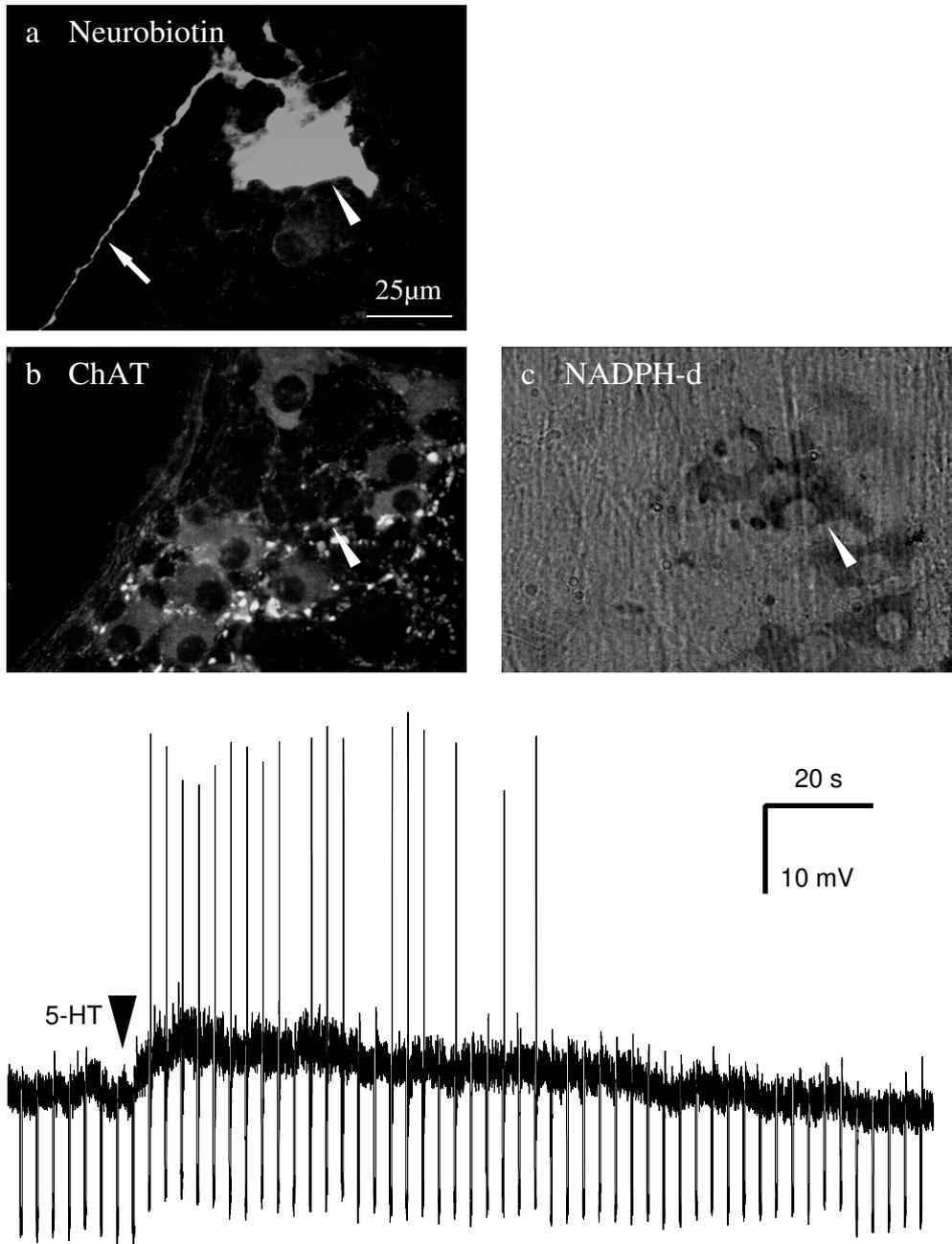


Abbildung 3.6: Neurone mit  $5\text{-HT}_{1P}$ -Antwort sind primär  $\text{NOS}^{\oplus}$  und projizieren in anale Richtung. Im oberen Teil ist ein Neurobiotin-gefülltes Neuron zu sehen (a), der Zellkörper ist mit einer Pfeilspitze markiert, das aboral projizierende Axon mit einem Pfeil. Das Neuron ist  $\text{ChAT}^{\ominus}$  (b) und  $\text{NOS}^{\oplus}$  (c). Statt einer Anti-NOS Färbung wurde eine Färbung für NADPH-Diaphorase durchgeführt. Der untere Teil zeigt die langsame Depolarisation des Membranpotentials des Neurons nach Spritzapplikation (Pfeilspitze) (400 ms) von Serotonin. Während der Depolarisation traten Aktionspotentialentladungen auf. Während des Versuches wurden hyperpolarisierende Strompulse konstanter Amplitude in die Zelle injiziert um Veränderungen des Membranwiderstandes beobachten zu können. Schwankungen des Membranpotentials verhinderten die Auswertung des Membranwiderstandes

### Serotonin und Korrelationen mit den übrigen Zelleigenschaften

Für diese Auswertungen wurden nur die Neurone mit 5-HT<sub>3</sub>-Antwort, 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort und ohne Antwort auf Serotonin-Applikation herangezogen. Die Gruppe der Neurone mit der kombinierten 5-HT<sub>3</sub> /5-HT<sub>1P</sub>-Antwort war zu klein um statistische Vergleiche anstellen zu können. Einige Präparate in denen Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort vorhanden waren, wurden zum direkten Nachweis von nitroxidergen Neurone mit der NADPH-diaphorase Technik gefärbt (siehe Seite 17). Die Zahlen für die Korrelationen zwischen Serotoninantwort und Neuroengruppe sind in Tabelle 3.6 zusammengefaßt.

Neurone mit verschiedenen Serotonin-Rezeptoren unterschieden sich signifikant in ihrem neurochemischen Code und in der Projektionsrichtung ihres Axons. Neurone mit 5-HT<sub>3</sub>-Antwort waren signifikant häufiger ChAT $\oplus$  als Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort, Neurone ohne Serotonin-Antwort und als die Gesamtheit der untersuchten Neurone. Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort hingegen waren überwiegend NOS $\oplus$  und unterschieden sich damit signifikant sowohl von den 5-HT<sub>3</sub>-Neurone als auch von Neurone ohne 5-HT Antwort und der Gesamtheit der untersuchten Neurone (5-HT<sub>3</sub>: 86 % ChAT $\oplus$ , 14 % NOS $\oplus$ , 5-HT<sub>1P</sub>: 29 % ChAT $\oplus$ , 71 % NOS $\oplus$ , keine 5-HT Antwort: 55 % ChAT $\oplus$ , 45 % NOS $\oplus$ , siehe auch Tabellen 3.6 und 3.2).

Neurone mit verschiedenen Serotonin-Rezeptoren unterschieden sich in der Projektion ihrer Axone. 5-HT<sub>3</sub>-Neurone projizierten vorwiegend in orale Richtung.

Dies unterschied sie von der Gesamtheit der untersuchten Neurone und von Neuronen mit 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort und Neuronen ohne Serotonin-Antwort. Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort projizierten zum größten Teil in anale Richtung und unterschieden sich damit von den anderen untersuchten Zellgruppen. Nur Neurone ohne Serotonin-Antwort zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich ihrer Projektionsrichtungen (Abbildung 3.8).

Beziehungen zwischen neurochemischem Code, Projektion und Serotonin-Antwort sind in Abbildung 3.9 dargestellt. In der Gruppe der anal projizierenden Neurone mit 5-HT<sub>3</sub>-Antwort waren signifikant mehr ChAT $\oplus$  Neurone als in den Gruppen der anal projizierenden Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>- bzw. ohne Antwort.

Neurone mit verschiedenen Serotoninrezeptoren unterschieden sich nicht signifikant bezüglich ihrer elektrischen Erregbarkeit (5-HT<sub>3</sub>: 46 % Gastric-I, 53 % Gastric-II, 1 % Gastric-III, 5-HT<sub>1P</sub>: 57 % Gastric-I, 41 % Gastric-II, 2 % Gastric-III, keine 5-HT Antwort: 54 % Gastric-I, 39 % Gastric-II, 7 % Gastric-III). Nur die descendierenden Neurone mit 5-HT<sub>3</sub>-Antwort waren signifikant häufiger vom Gastric-II Typ als die anderen Neuronengruppen und als die

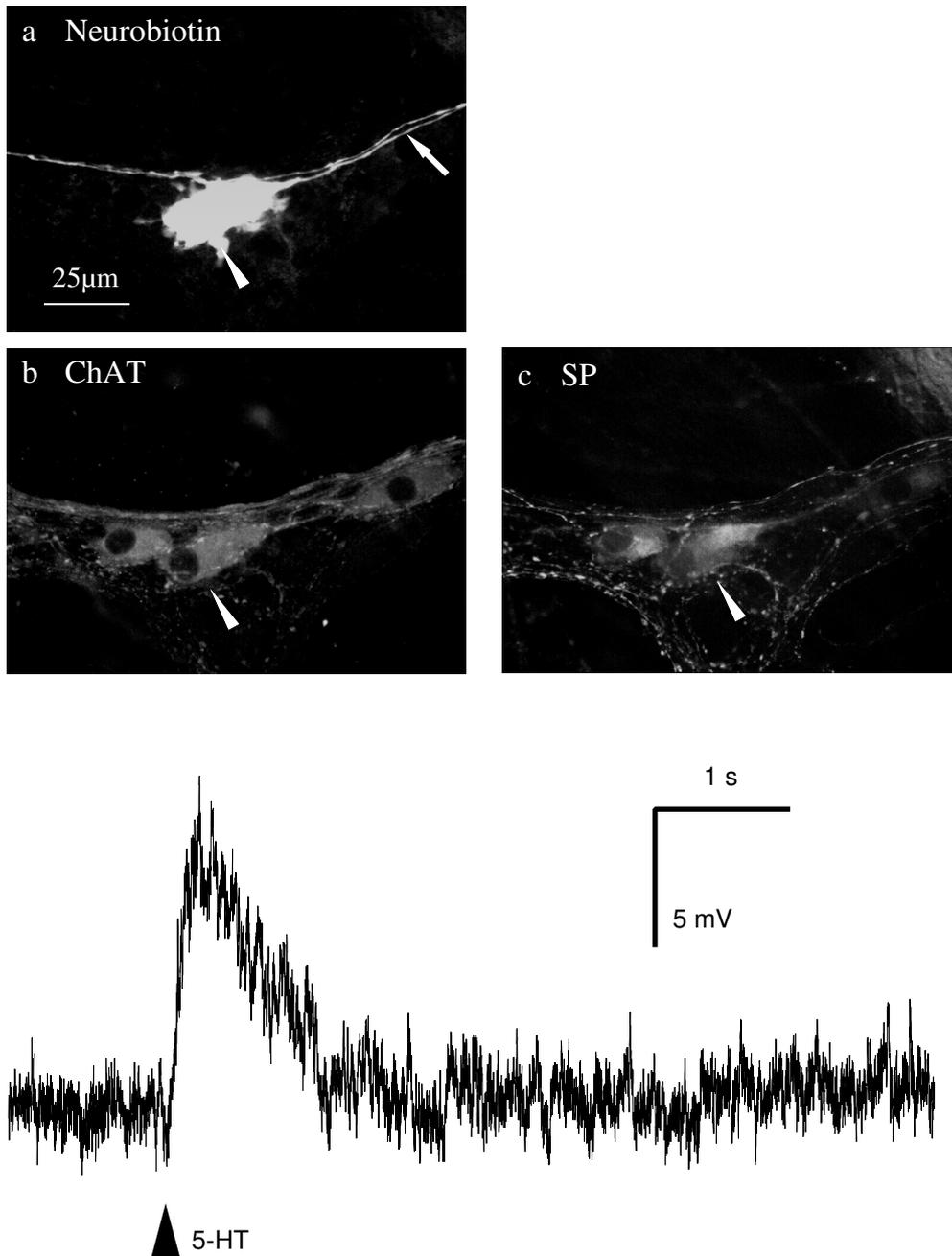


Abbildung 3.7: Neurone mit  $5\text{-HT}_3$  Antwort sind primär  $\text{ChAT}^{\oplus}$  und projizieren in orale Richtung. Im oberen Teil ist ein Neurobiotin-gefülltes Neuron zu sehen (a), der Zellkörper ist mit einer Pfeilspitze markiert, das oral projizierende Axon mit einem Pfeil. Das zweite durch das Bild laufende Axon stammte von einer anderen Zelle. Das Neuron ist  $\text{ChAT}^{\oplus}$  (b) und  $\text{SP}^{\oplus}$  (c). Der untere Teil zeigt die kurzdauernde Depolarisation des Membranpotentials des Neurons nach Spritzapplikation (Pfeilspitze) (200 ms) von Serotonin.

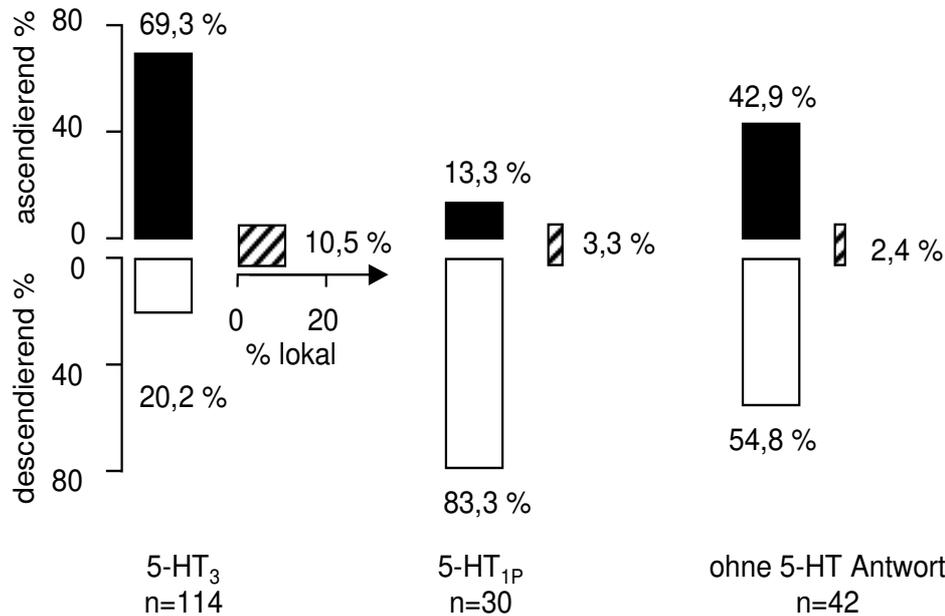


Abbildung 3.8: Neurone mit verschiedenen Serotonin-Rezeptoren unterscheiden sich signifikant in der Projektionsrichtung ihrer Axone. Für die Gruppen mit verschiedenen Antworten auf Serotoninapplikation sind die Anteile von oral (schwarze Balken), anal (weiße Balken) und lokal (gestreifte Balken) projizierenden Neuronen dargestellt.

Gesamtheit der descendierenden Neurone (5-HT<sub>3</sub>: 9 Gastric-I, 16 Gastric-II, 5-HT<sub>1P</sub>: 16 Gastric-I, 8 Gastric-II, keine 5-HT Antwort: 17 Gastric-I, 6 Gastric-II). Bei den ascendierenden Neuronen waren bezüglich Serotonin-Antwort und elektrischer Erregbarkeit keine signifikanten Unterschiede festzustellen (5-HT<sub>3</sub>: 44 Gastric-I, 34 Gastric-II, 5-HT<sub>1P</sub>: 3 Gastric-I, 1 Gastric-II, keine 5-HT Antwort: 7 Gastric-I, 11 Gastric-II). Es zeigte sich auch kein Unterschied beim Auftreten von sEPSP's, dies könnte aber auch an den geringen Fallzahlen, insbesondere für die Gruppe der 5-HT<sub>1P</sub>-Neurone, liegen (5-HT<sub>3</sub>: 10 kein sEPSP, 6 mit sEPSP, 5-HT<sub>1P</sub>: 0 kein sEPSP, 2 mit sEPSP, keine 5-HT Antwort: 5 kein sEPSP, 2 mit sEPSP). Das Auftreten von Reaktionen nach Stimulation des N. Vagus und Antworten bei Applikation von Serotonin waren ebenfalls nicht signifikant korreliert (5-HT<sub>3</sub>: 59 mit Reaktion, 20 ohne Reaktion; 5-HT<sub>1P</sub>: 16 mit Reaktion, 3 ohne Reaktion; ohne 5-HT Antwort: 27 mit Reaktion, 6 ohne Reaktion).

Funktion und Serotonin-Antwort der Neurone waren nicht signifikant korreliert (Interneurone: 64 % 5-HT<sub>3</sub>, 19 % 5-HT<sub>1P</sub>, 17 % keine 5-HT Antwort, multifunktionelle Neurone: 57 % 5-HT<sub>3</sub>, 14 % 5-HT<sub>1P</sub>, 29 % ohne Antwort, Motorneurone 67 % 5-HT<sub>3</sub>, 12 % 5-HT<sub>1P</sub>, 21 % keine 5-HT Antwort). Auch bei weiteren

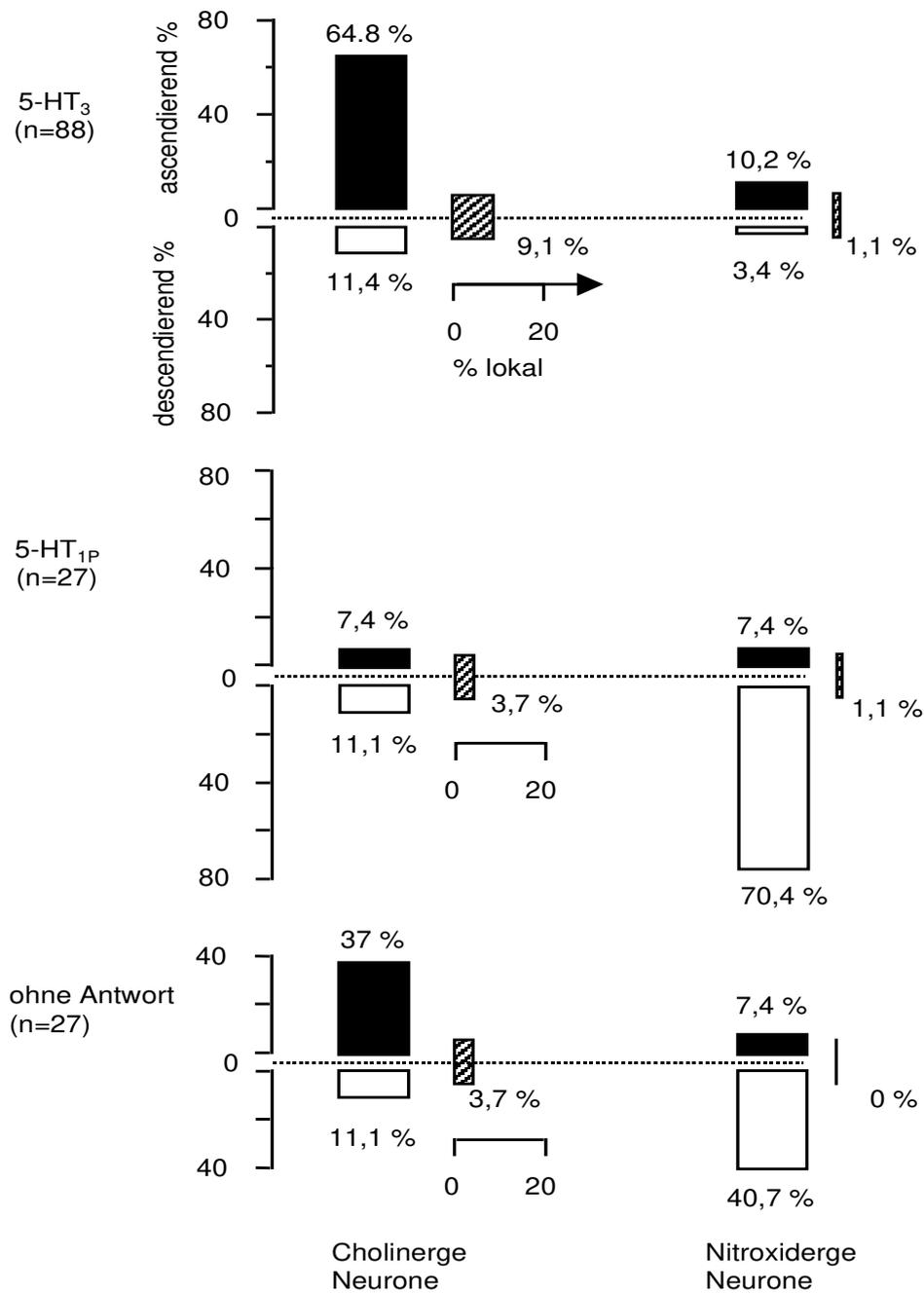


Abbildung 3.9: Neurone mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind primär ChAT<sup>+</sup> und projizieren in oraler Richtung, während Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptoren vorwiegend NOS<sup>+</sup> sind und in analer Richtung projizieren. Dargestellt sind für Neurone mit einem bestimmten 5-HT-Rezeptor die Anteile mit oraler, analer und lokaler Projektionsrichtung, aufgeteilt für die ChAT<sup>+</sup> (links) und die NOS<sup>+</sup> (rechts) Neurone.

Verknüpfungen der Merkmale Erregbarkeit, neurochemischer Code, Projektion und Serotonin-Antwort der Neurone waren keine zusätzlichen signifikanten Abhängigkeiten zu finden.

Tabelle 3.6: Serotoninwirkung bei verschiedenen Neuronenklassen

	5-HT <sub>3</sub> Antwort	5-HT <sub>1P</sub> Antwort	keine 5-HT Antwort
Alle Neurone	149	41	58
Gastric-I	68	24	32
Gastric-II	78	17	23
Gastric-III	2	1	4
sEPSP $\oplus/\ominus$	10 / 6	0 / 2	5 / 2
ChAT $\oplus$ /NOS $\oplus$	82 / 13	10 / 24	16 / 13
NPY $\oplus$ /NPY $\ominus$	14 / 22	5 / 6	7 / 6
SP $\oplus$ /SP $\ominus$	22 / 65	2 / 24	5 / 27
DBH $\oplus$ /DBH $\ominus$	5 / 66	2 / 17	1 / 26
ascendierend	79	4	18
descendierend	23	25	23
lokal	12	1	1
Interneurone	23	7	6
multifkt. Neurone	4	1	2
Motorneurone	32	6	10

Alle Angaben beziehen sich auf Anzahlen von Zellen. Insgesamt wurden 257 Neurone untersucht, bei 8 Neuronen traten 5-HT<sub>3</sub>-, und 5-HT<sub>1P</sub>-Wirkung zusammen auf.

### ***In Vitro*-Motilitätsmessungen und Serotoninwirkung**

Aus den elektrophysiologischen Versuchen konnte geschlossen werden, daß Serotonin über verschiedene Rezeptortypen unterschiedliche Wirkungen auf die Motilität ausüben kann. Um dies zu überprüfen wurde die Wirkung von Serotoninagonisten und -antagonisten auf die *in vitro*-Motilität getestet. Wie unter *Material und Methoden* beschrieben wurden dazu Kraftmessungen an Muskelpräparaten aus dem Korpus des Meerschweinchenmagens durchgeführt. Zum einen wurde die Wirkung der Pharmaka auf die Antwort nach elektrischer Feldstimulation untersucht. Die Parameter für die Feldstimulation wurden dabei so gewählt, daß die Muskulatur des Präparates nicht direkt stimuliert wurde, sondern nur Nervenfasern und Neurone. Eine Änderung der Antwort nach Zugabe einer Substanz spiegelte also die Wirkung dieser Substanz auf den Plexus wie-

der. In einer weiteren Versuchsserie wurden Veränderungen im Basistonus des Präparates nach Zugabe der Pharmaka registriert. Diese Reaktionen können sowohl durch Wirkung der Substanzen auf den Plexus als auch direkt auf die Muskulatur vermittelt werden. Die Antwort des Gewebes auf Feldstimulation bestand aus einer initialen Kontraktion (während der Dauer der Stimulation) die als 'on-response' bezeichnet wird. Diese wurde von einer kurzdauernden weiteren Kontraktion oder Relaxation und schließlich von einer länger dauernden Relaxation gefolgt (siehe Kontroll-Antworten in Abbildung 3.10). Für die Auswertung wurde die Veränderung der on-response analysiert, da die Auswirkungen auf die anderen Teile der Antwort stark schwankten. Die Stärke der Kontroll-Antwort wurde dabei zu 100 % gesetzt. Eine Verkleinerung der Kontraktion nach Zugabe einer Substanz ergab dann einen Wert kleiner als 100 %. Beispiele für die Wirkungen des 5-HT<sub>3</sub>-Agonisten 2-methyl-5-HT und

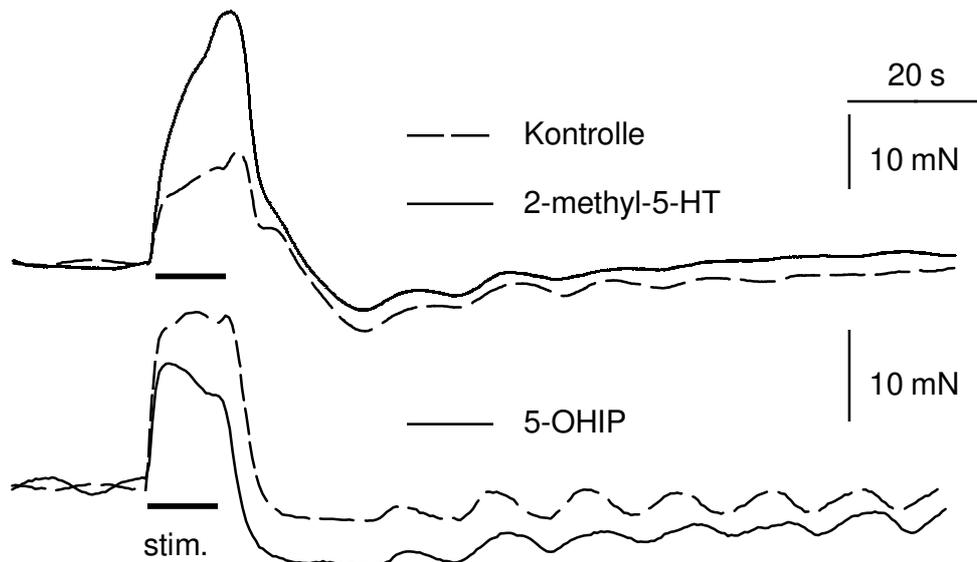


Abbildung 3.10: Der 5-HT<sub>3</sub>-Agonist 2-methyl-5-HT (oben) verstärkt die kontraktile Antwort des Gewebes bei elektrischer Feldstimulation, während der 5-HT<sub>1P</sub>-Agonist 5-OHIP (unten) die Antwort verkleinert. Dargestellt sind die Antworten der Gewebe als Kontrolle (---) und nach Zugabe des Agonisten (—). Die elektrische Feldstimulation (10 s) ist durch einen horizontalen Strich angedeutet. Konzentrationen: 2-methyl-5-HT: 20 µM, 5-OHIP: 10 µM.

des 5-HT<sub>1P</sub>-Agonisten 5-OHIP zeigt Abbildung 3.10. Der 5-HT<sub>3</sub>-Agonist bewirkte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Kontraktion während der on-response, während der 5-HT<sub>1P</sub>-Agonist die on-response konzentrationsabhängig reduzierte. Die Wirkungen der Agonisten bei verschiedenen Konzentrationen sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Auswirkungen der beiden Agonisten auf

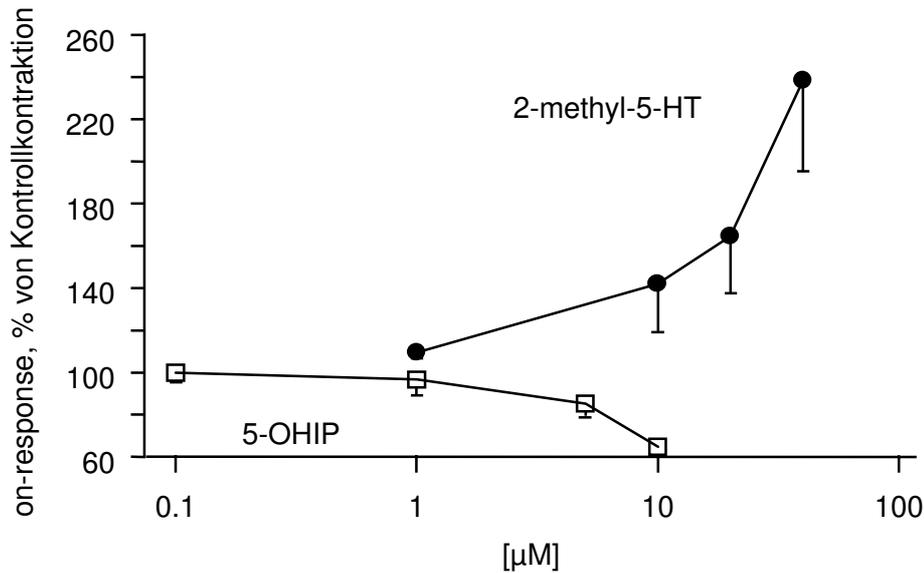


Abbildung 3.11: Der  $5\text{-HT}_3$ -Agonist 2-methyl-5-HT (obere Kurve) verstärkt konzentrationsabhängig die on-response bei elektrischer Feldstimulation, während der  $5\text{-HT}_{1P}$ -Agonist 5-OHIP (untere Kurve) die on-response konzentrationsabhängig vermindert. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardfehler gezeigt und stammen aus jeweils 2-3 Experimenten.

den Basistonus der Zirkulärmuskulatur sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Der  $5\text{-HT}_3$ -Agonist bewirkte eine konzentrationsabhängige Zunahme des Basistonus, während der  $5\text{-HT}_{1P}$ -Agonist eine konzentrationsabhängige Verminderung des Basistonus bewirkte. Die Werte für 2-methyl-5-HT sind als prozentualer Teil einer maximalen Kontraktion bei elektrischer Feldstimulation dargestellt. Ein Wert von 10 % bedeutet also, daß der Basistonus des Präparates sich durch Zugabe der Substanz auf 10 % der maximalen Kontraktion erhöhte. Die Werte für 5-OHIP sind als Prozent der maximalen Relaxation bei Feldstimulation unter Atropin gezeigt. Unter Atropin läßt sich mit Feldstimulation nur noch eine Relaxation des Gewebes auslösen, da die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren der Muskulatur blockiert sind. Die Versuche zum Basistonus mit 2-methyl-5-HT wurden mit  $200 \mu\text{M}$  Hexamethonium im Organbad durchgeführt. Das Hexamethonium blockierte die nicotineren Kontakte, die praktisch alle Neurone des Magens haben und unterdrückte damit die cholinerge neuronale Kommunikation. Unter diesen Bedingungen konnte die direkte Wirkung von 2-methyl-5-HT auf Motorneurone bestimmt werden. Bei den Messungen mit 5-OHIP befand sich Atropin in einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  im Organbad. Dies blockierte cholinerge Wirkungen auf die Muskulatur und erlaubte eine Bestimmung der relaxierenden Wirkung des Agonisten.

Die durch eine Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  2-methyl-5-HT hervorgerufene Kontraktion konnte durch  $0,5 \mu\text{M}$  Atropin um 77 % vermindert werden ( $n=2$ ). Dies legt eine Beteiligung cholinergischer Motorneurone nahe. Durch eine Vorbehandlung des Gewebes mit dem  $5\text{-HT}_{1P}$ -Antagonisten 5-HTP-DP ( $50 \mu\text{M}$ ) wurde die Relaxation durch  $10 \mu\text{M}$  5-OHIP unterdrückt.

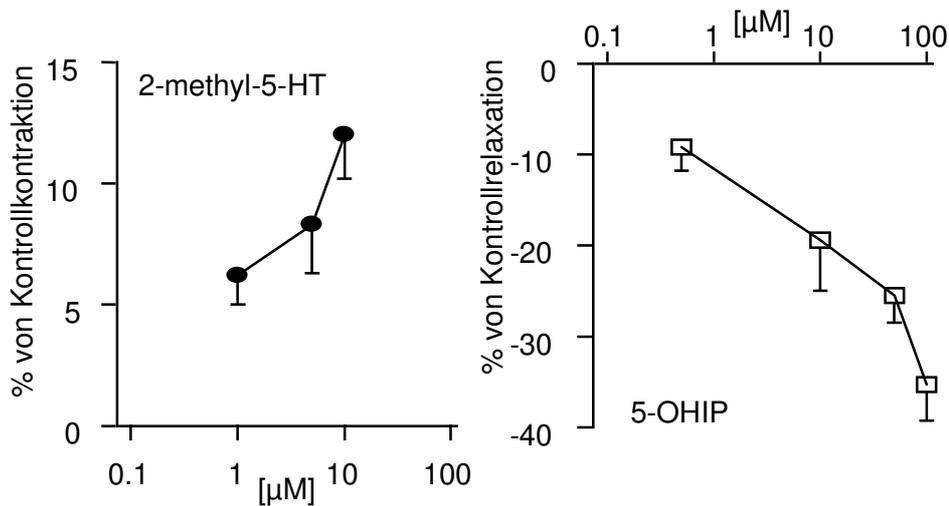


Abbildung 3.12: Der  $5\text{-HT}_3$ -Agonist 2-methyl-5-HT (linke Kurve) verstärkt konzentrationsabhängig den Basistonus, während der  $5\text{-HT}_{1P}$ -Agonist 5-OHIP (rechte Kurve) den Basistonus konzentrationsabhängig vermindert. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardfehler gezeigt und stammen aus jeweils 2-3 Experimenten.

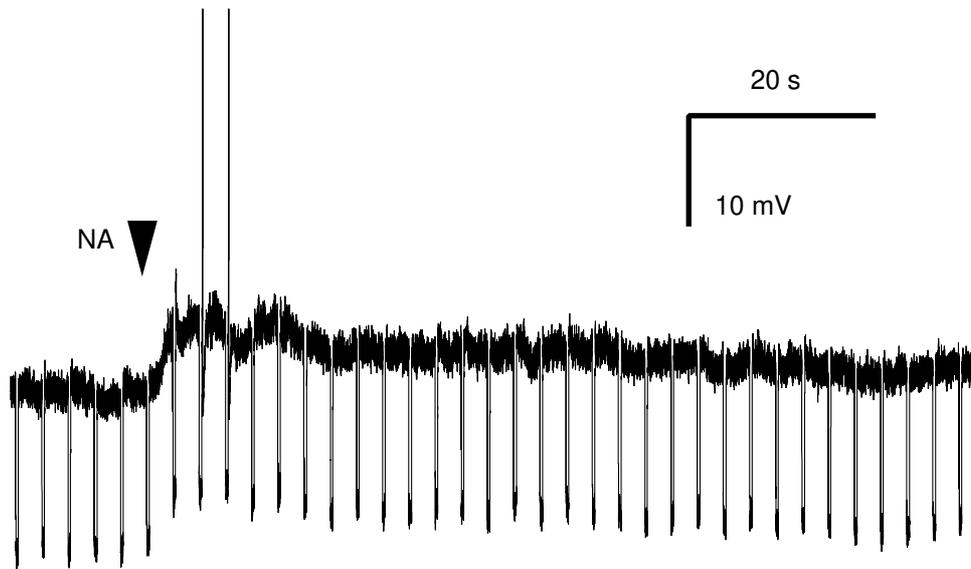


Abbildung 3.13: Durch  $\alpha_1$ -Rezeptor vermittelte Antwort auf die Spritzapplikation (Pfeilspitze) (200 ms) von Noradrenalin. Das Membranpotential des Neurons zeigt eine langsame Depolarisation, verbunden mit der Entladung von zwei Aktionspotentialen. Während des Versuches wurden hyperpolarisierende Strompulse konstanter Amplitude in die Zelle injiziert um Veränderungen des Membranwiderstandes beobachten zu können. Aufgrund der Schwankungen des Membranpotentials war jedoch keine Auswertung des Membranwiderstandes möglich.

### 3.5.2 Noradrenalin

Durch Spritzapplikation von Noradrenalin konnten sowohl erregende als auch hemmende Antworten an Neuronen ausgelöst werden. Die erregende Antwort wurde durch postsynaptische  $\alpha_1$ -Rezeptoren vermittelt [SCHEMANN 1991b, TACK und WOOD 1992] und bestand aus einer langanhaltenden, langsam einsetzenden Depolarisation (Abbildung 3.13), die manchmal mit Aktionspotentialentladungen verbunden war. Eine hemmende Wirkung von Noradrenalin wurde durch präsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermittelt [SCHEMANN 1991b, TACK und WOOD 1992]. Sie äußerte sich in der Hemmung eines extrinsischen oder intrinsischen Inputs des Neurons (Abbildung 3.15). Manche Neurone zeigten nach der Applikation von Noradrenalin eine rasch einsetzende Hyperpolarisation des Membranpotentials (Abbildung 3.14) die im folgenden als postsynaptische Hemmung bezeichnet wird. Diese Art der Antwort wurde im Magen bislang noch nicht beschrieben. In anderen Teilen des Gastrointestinaltraktes wird eine ähnliche Wirkung durch postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermittelt [NORTH und SURPRENANT 1985, GALLIGAN und NORTH 1991, DOBREVA et al. 1998].

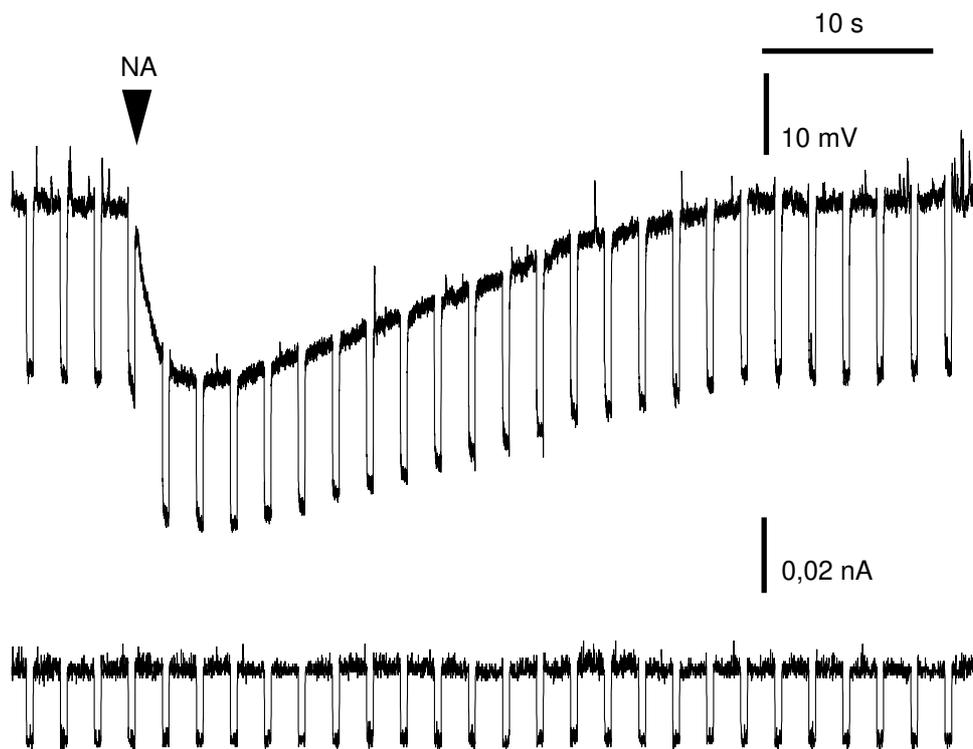


Abbildung 3.14: Spritzapplikation von Noradrenalin kann eine Hyperpolarisation des Membranpotentials eines Neurons auslösen. Die Spritzapplikation von Noradrenalin (300 ms) ist durch eine Pfeilspitze angedeutet. Während des Versuches wurden hyperpolarisierende Strompulse konstanter Amplitude (unterer Teil) in die Zelle injiziert um Veränderungen des Membranwiderstandes beobachten zu können. Zu Beginn der Antwort ist eine leichte Verminderung des Membranwiderstandes zu erkennen.

Es wurden insgesamt 175 Neurone untersucht. Bei 15 % der Neurone trat eine durch  $\alpha_1$ -Rezeptoren vermittelte erregende Antwort auf. Bei 37 % wurde eine präsynaptische Hemmung ( $\alpha_2$ ) beobachtet. Dabei wurde bei 30 % ein intrinsischer Input, bei 4 % ein extrinsischer Input und bei 2 % sowohl ein intrinsischer als auch ein extrinsischer Input gehemmt. Daß die Wirkung des Noradrenalins auf präsynaptischen Mechanismen beruht, wurde in zwei Fällen durch Spritzapplikation von Acetylcholin überprüft: Bei Hemmung eines Inputs durch Noradrenalin konnte durch die Gabe von Acetylcholin durch eine Spritzpipette immer noch eine nicotinerge Antwort gleicher Amplitude am betreffenden Neuron ausgelöst werden. Dies zeigte, daß das Noradrenalin keine Wirkung auf die postsynaptische Membran hatte, sondern die Ausschüttung von Acetylcholin präsynaptisch hemmte. In 10 % der Neurone löste Noradrenalin eine postsynaptische Hemmung aus. Bei 37 % der Neurone hatte Noradrenalin keine Wirkung.

### Noradrenalin und Korrelationen mit den übrigen Zelleigenschaften

Für diese Untersuchungen wurden die Untergruppen der Neurone mit präsynaptischer Hemmung (Hemmung von intrinsischen und/oder extrinsischen Inputs) zu einer Gruppe zusammengefaßt. Folgende Gruppen wurden also für die Vergleiche verwendet: keine Noradrenalin Antwort (als 'keine NA Antwort' abgekürzt), präsynaptische Hemmung, postsynaptische Hemmung,  $\alpha_1$ -Antwort. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 als Absolutzahlen zusammengefaßt.

Neurone die auf die Applikation von Noradrenalin mit einer postsynaptischen Hemmung reagierten waren signifikant häufiger vom Typ Gastric-I als die anderen untersuchten Gruppen und als die Gesamtheit der Neurone (Abbildung 3.14) (keine NA Antwort: 54 % Gastric-I, 46 % Gastric-II, präsynapt. Hemmung: 42 % Gastric-I, 53 % Gastric-II, postsynapt. Hemmung: 94 % Gastric-I, 6 % Gastric-II,  $\alpha_1$ -Antwort: 46 % Gastric-I, 54 % Gastric-II). Für die Neurone mit unterschiedlichen Noradrenalin-Antworten konnten keine Unterschiede bezüglich des Auftretens von sEPSP's ermittelt werden. Wie bei den Neuronen mit unterschiedlichen Serotoninwirkungen waren jedoch die Fallzahlen klein (keine NA Antwort: 5 ohne sEPSP, 4 mit sEPSP, präsynapt. Hemmung: 8 ohne sEPSP, 2 mit sEPSP, postsynapt. Hemmung: 1 ohne sEPSP, 1 mit sEPSP,  $\alpha_1$ -Antwort: 2 ohne sEPSP, 1 mit sEPSP). Neurone mit bzw. ohne Reaktion nach Stimulation des N. Vagus zeigten keine Unterschiede bezüglich ihrer Antwort auf die Gabe von Noradrenalin (keine NA Antwort: 26 mit Reaktion, 8 ohne Reaktion; präsynapt. Hemmung: 32 mit Reaktion, 9 ohne Reaktion; postsynapt. Hemmung: 5 mit Reaktion, 2 ohne Reaktion;  $\alpha_1$ -Antwort: 10 mit Reaktion, 2 ohne Reaktion).

Beim Vergleich des neurochemischen Codes mit den Noradrenalin-Antworten

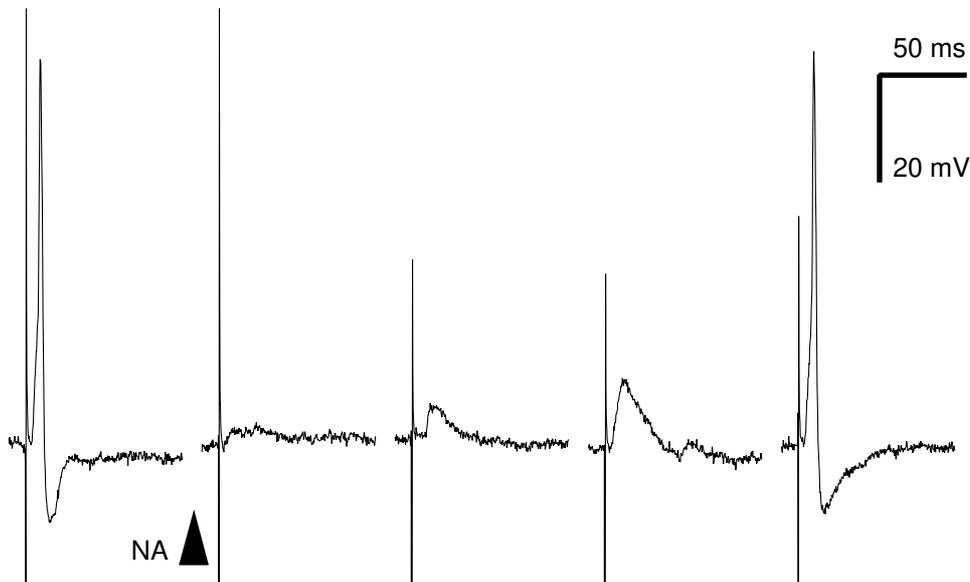


Abbildung 3.15: Durch  $\alpha_2$ -Rezeptor vermittelte präsynaptische Hemmung einer synaptischen Antwort. Durch Gabe von Strompulsen auf einen interganglionären Faserstrang wurden in Abständen von 5 s fEPSP-getriggerte Aktionspotentiale an einem Neuron ausgelöst. Der Stimulationsartefakt ist jeweils als senkrechter Strich vor dem Aktionspotential zu erkennen. Spritzapplikation von Noradrenalin (Pfeilspitze) (200 ms) führte zu einer Blockade des Aktionspotentials. Die nächsten zwei Stimulationen lösten nur fEPSP's aus, erst bei der dritten Stimulation kam es wieder zur Auslösung eines Aktionspotentials.

der Neurone waren die Neurone mit präsynaptischer Hemmung signifikant häufiger ChAT $\oplus$  als die Gesamtpopulation der Neurone und als die Neurone mit postsynaptischer Hemmung (keine NA Antwort: 73 % ChAT $\oplus$ , 27 % NOS $\oplus$ , präsynapt. Hemmung: 93 % ChAT $\oplus$ , 7 % NOS $\oplus$ , postsynapt. Hemmung: 45 % ChAT $\oplus$ , 55 % NOS $\oplus$ ,  $\alpha_1$ -Antwort: 72 % ChAT $\oplus$ , 8 % NOS $\oplus$ ). Weitere signifikante Unterschiede waren bei diesem Vergleich nicht zu ermitteln.

Keine der Neuronengruppen mit einer bestimmten Antwort auf Noradrenalin zeigte signifikante Unterschiede in der Projektionsrichtung (keine NA Antwort: 57 % asc., 38 % desc., 5 % lokal, präsynapt. Hemmung: 64 % asc., 25 % desc., 11 % lokal, postsynapt. Hemmung: 30 % asc., 70 % desc.,  $\alpha_1$ -Antwort: 43 % asc., 50 % desc., 7 % lokal).

Neurone ohne Noradrenalin-Antwort waren signifikant häufiger Interneurone als Neurone mit einer präsynaptischen Hemmung und als die Neurone der Gesamtpopulation. Weitere signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen funktionellen Klassen waren nicht zu ermitteln. (keine NA Antwort: 54 % Interneurone, 13 % multifunkt. Neurone, 33 % Motorneurone, präsynapt. Hemmung: 29 % Interneurone, 4 % multifunkt. Neurone, 67 % Motorneurone, postsynapt.

Hemmung: 43 % Interneurone, 14 % multifunkt. Neurone, 43 % Motorneurone,  $\alpha_1$ -Antwort: 33 % Interneurone, 17 % multifunkt. Neurone, 50 % Motorneurone).

Tabelle 3.7: Noradrenalinwirkung bei verschiedenen Neuronenklassen

	$\alpha_1$ Antwort	präsynapt. Hemmung	postsynapt. Hemmung	keine NA Antwort
Alle Neurone	29	64	17	65
Gastric-I	13	26	15	34
Gastric-II	14	33	1	29
Gastric-III	1	3	0	0
sEPSP $\oplus/\ominus$	2 / 1	2 / 8	1 / 1	4 / 5
ChAT $\oplus$ /NOS $\oplus$	13 / 5	26 / 2	5 / 6	19 / 7
NPY $\oplus$ /NPY $\ominus$	4 / 2	3 / 9	4 / 4	6 / 6
SP $\oplus$ /SP $\ominus$	2 / 13	7 / 24	1 / 7	9 / 26
DBH $\oplus$ /DBH $\ominus$	3 / 14	2 / 27	1 / 1	2 / 30
ascendierend	12	28	3	24
descendierend	14	11	7	16
lokal	2	5	0	2
Interneurone	2	7	3	13
multifkt. Neurone	1	1	1	3
Motorneurone	3	16	3	8

Alle Angaben beziehen sich auf Anzahlen von Zellen. Insgesamt wurden 175 Neurone untersucht.

### 3.5.3 Stickoxid

Es sollte der Einfluß von Stickoxid auf intrinsische bzw. extrinsische Inputs der Neurone untersucht werden. Zunächst wurde Nitroprussid-Natrium-Dihydrat (ein NO-Donor, im folgenden mit Nitroprussid bezeichnet) über Spritzpipetten appliziert (n=26). Nitroprussid spaltet in Lösung und unter Lichteinwirkung Stickoxid ab. Bei dieser Art der Applikation waren keine Veränderungen an Inputs, Membranpotentialen oder Membranwiderständen zu beobachten. Außerdem wurden noch Perfusionsexperimente mit dem gleichen NO-Donor durchgeführt. Bei einer Konzentration von 1 mM in der Perfusionslösung wurde in zwei von 22 Fällen (9 %) die Inhibition eines intrinsischen Inputs beobachtet (Abbildung 3.16). Wirkungen auf vagale Inputs wurden nicht beobachtet (n=7). Schließlich wurde noch die Wirkung von NO auf langsame erregende postsynaptische Potentiale (sEPSP's) untersucht. Dazu wurden sEPSP's durch die Gabe von Pulsfolgen auf intrinsische Faserstränge ausgelöst. Es wurden keine Wirkungen festgestellt (n=7). In zwei Versuchen wurde vor und während einer Perfusion mehrmals Acetylcholin durch Spritzpipetten appliziert. In beiden Fällen wurde eine durch nicotinerge Rezeptoren vermittelte rasche Depolarisation beobachtet, [SCHEMANN und WOOD 1989b] die durch NO nicht beeinflusst wurde.

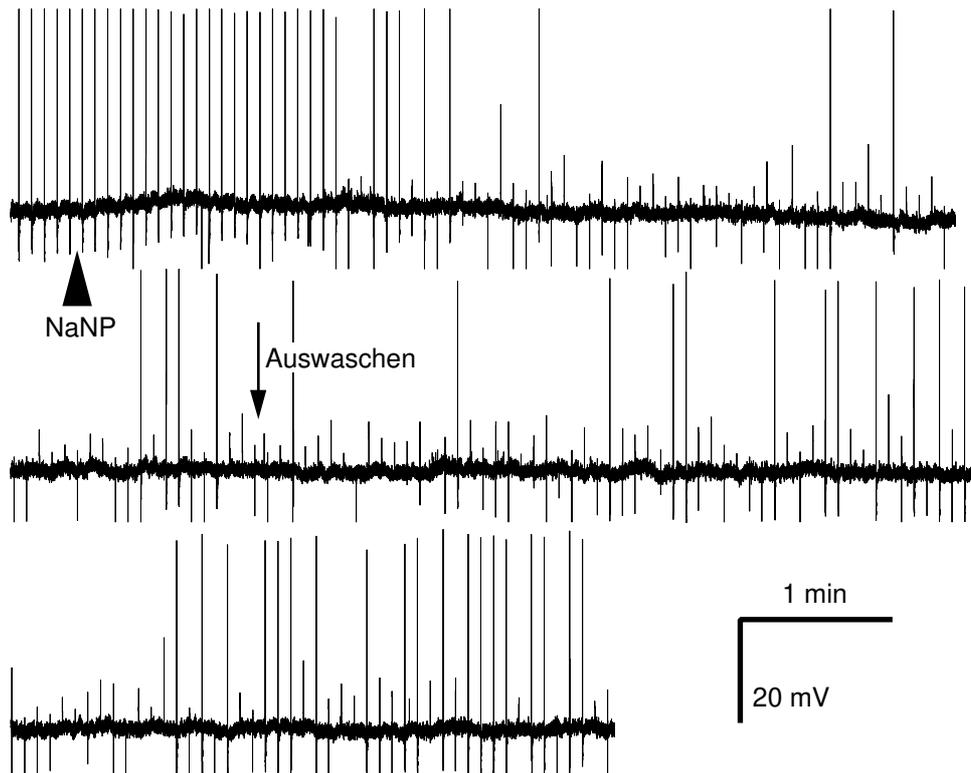


Abbildung 3.16: NO kann synaptische Antworten hemmen. Durch Stimulation eines interganglionären Faserstrangs wurden im Abstand von 5 s fEPSP-getriggerte Aktionspotentiale an einem Neuron ausgelöst. Aufgrund der gestauchten Zeitachse sind die Aktionspotentiale nur als senkrechte Striche zu sehen. Perfusion mit 1 mM des NO-Donors Nitroprussid (Pfeilspitze) bewirkte eine teilweise Hemmung der Aktionspotentiale, so daß nur noch Stimulationsartefakte zu erkennen waren. Auswaschen des NO-Donors (Pfeil) bewirkte eine Aufhebung der Hemmung, so daß wieder häufiger Aktionspotentiale ausgelöst wurden.

### 3.5.4 Glycin

Die Wirkung der Spritzapplikation von Glycin wurde bei 50 Neuronen untersucht. In 26 % der Neurone (13 von 50) trat eine rasch einsetzende Depolarisation auf, die bei wiederholter Applikation desensibilisierte (Abbildung 3.17). Die Stärke der Depolarisation betrug durchschnittlich  $11,8 \text{ mV} \pm 4,6 \text{ mV}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=13$ ). Zur Charakterisierung des Rezeptortyps wurde Strychnin in einer Konzentration von 300 nM ( $n=3$ ) perfundiert. In allen Fällen wurde die Glycin-Antwort vollständig blockiert und die Neurone konnten bis zur Wiederkehr der Antwort nach einer Auswaschperiode gehalten werden (Abbildung 3.18). Bei den anderen 74 % der Neurone wurden keine Änderungen des Membranpotentials oder der Erregbarkeit bei Applikation von Glycin beobachtet. Der Einfluß des Membranpotentials auf die Stärke der Depolarisation bei Glycinapplikation wurde bei 4 Neuronen untersucht. Dazu wurde über die intrazelluläre Elektrode ein konstanter Strom injiziert, der das Membranpotential auf einen bestimmten Wert klemmte und dann Glycin appliziert. Bei allen Versuchen wurde die Amplitude der Glycin-Antwort bei Hyperpolarisation der Zelle größer und bei Depolarisation der Zelle kleiner. Das Umkehrpotential lag zwischen -30 mV und -10 mV. Badperfusion mit Furosemid (1 mM), einem Hemmstoff für den Chloridtransport durch die Zellmembran, verringerte die Stärke der Glycin-Antwort ( $n=2$ ). Um einen Einfluß der hohen Chlorid-Konzentration in der intrazellulären Elektrode auf die Stärke der Glycin-Antwort auszuschließen [HILLE 1992], wurden Versuche mit Chlorid-freien Elektroden gemacht. Dazu wurde die 0,5 M KCl-Elektrodenlösung durch eine 0,5 M Kaliumacetatlösung ersetzt. Bei zwei Neuronen, die mit solchen Elektroden angestochen wurden, ließen sich Glycinantworten induzieren. Sie zeigten keine Unterschiede zu Glycinantworten von Neuronen die mit herkömmlichen Elektroden angestochen wurden.

Die depolarisierende Wirkung von Glycin und eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte Antwort sahen sehr ähnlich aus. Daher wurde bei 38 Neuronen sowohl Serotonin als auch Glycin appliziert. Bei 63 % wurde nur eine 5-HT<sub>3</sub> Wirkung beobachtet, 5 % zeigten sowohl eine 5-HT<sub>3</sub>- als auch eine Glycin-Wirkung, 16 % antworteten nur auf Glycin und bei weiteren 16 % hatte keines der beiden Pharmaka eine Wirkung.

In Tabelle 3.8 sind die Häufigkeiten der Glycinwirkung bei verschiedenen Neuronenklassen als Absolutwerte dargestellt. Von den Neurone mit Glycinwirkung waren 77 % vom Typ Gastric-I und 23 % vom Typ Gastric-II. Bei 50 % der Neurone konnte eine Projektion in oraler Richtung ermittelt werden, je 25 % projizierten in analer Richtung bzw. lokal. Weiterhin waren 55 % der Neurone

ChAT $\oplus$  und 45 % NOS $\oplus$ .

In keiner dieser Eigenschaften waren signifikante Unterschiede zu den Neurone ohne Glycinwirkung zu finden. Hier gab es 49 % Gastric-I und 51 % Gastric-II-Neurone, 70 % Neurone mit oraler, 22 % mit analer und 8 % mit lokaler Projektion sowie 86 % ChAT $\oplus$  und 14 % NOS $\oplus$  Neurone. Von den Neuronen mit Glycinwirkung hatten 6 synaptischen Kontakt zum N. Vagus, von den Neuronen ohne Glycinwirkung waren 20 mit bzw. 5 ohne synaptischen Kontakt zum N. Vagus. Zwischen diesen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu finden.

Weder die Gruppe der Neurone mit Depolarisation bei Applikation von Glycin noch die Gruppe ohne Glycinwirkung zeigte signifikante Unterschiede zur Gesamtpopulation aller untersuchten Neurone.

Tabelle 3.8: Glycinwirkung bei verschiedenen Neuronenklassen

	Depolarisation	keine Glycin Antwort
Alle Neurone	13	37
Gastric-I	10	17
Gastric-II	3	18
Gastric-III	0	0
sEPSP $\oplus/\ominus$	6 / 3	6 / 6
ChAT $\oplus$ /NOS $\oplus$	6 / 5	24 / 4
NPY $\oplus$ /NPY $\ominus$	4 / 7	11 / 15
SP $\oplus$ /SP $\ominus$	2 / 8	7 / 17
ascendierend	4	16
descendierend	2	5
lokal	2	2
Interneurone	1	2
multifkt. Neurone	1	0
Motorneurone	0	11

Alle Angaben beziehen sich auf Anzahlen von Zellen. Insgesamt wurden 50 Neurone untersucht. Während der Versuche mit Glycin wurden keine Färbungen für DBH mehr durchgeführt.

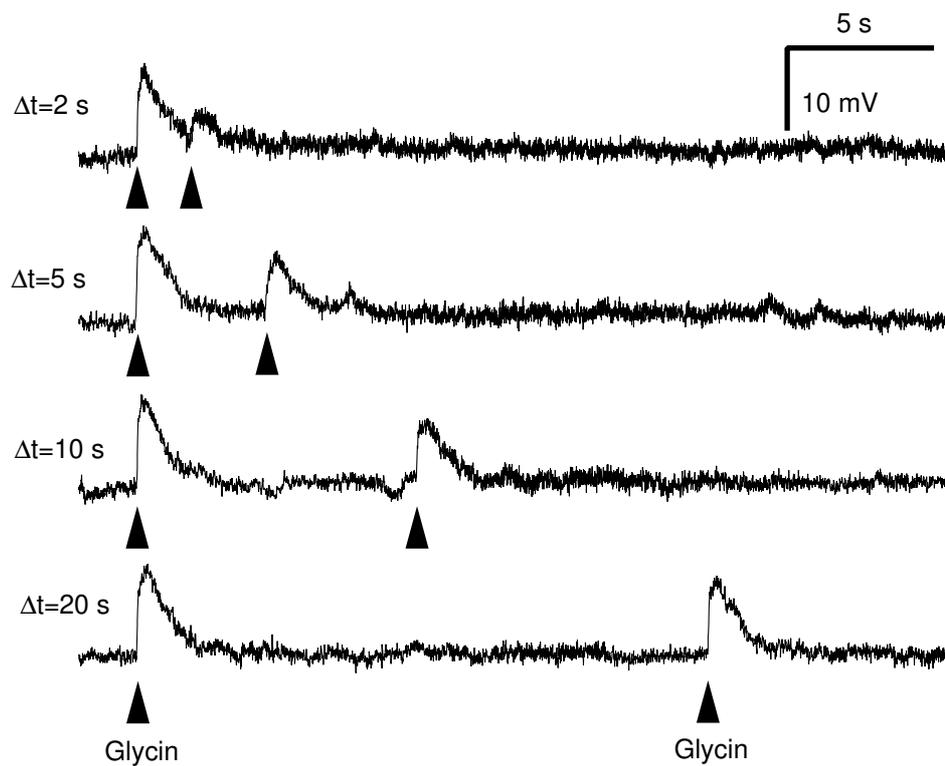


Abbildung 3.17: Glycin führt in einer Teilpopulation von Nervenzellen zu einer kurz-dauernden Depolarisation. Die Antwort desensibilisiert bei wiederholter Spritzapplikation (400 ms) von Glycin (Pfeilspitze). Erst bei einem Applikationsintervall von 20 s sind beide Antworten gleich groß.

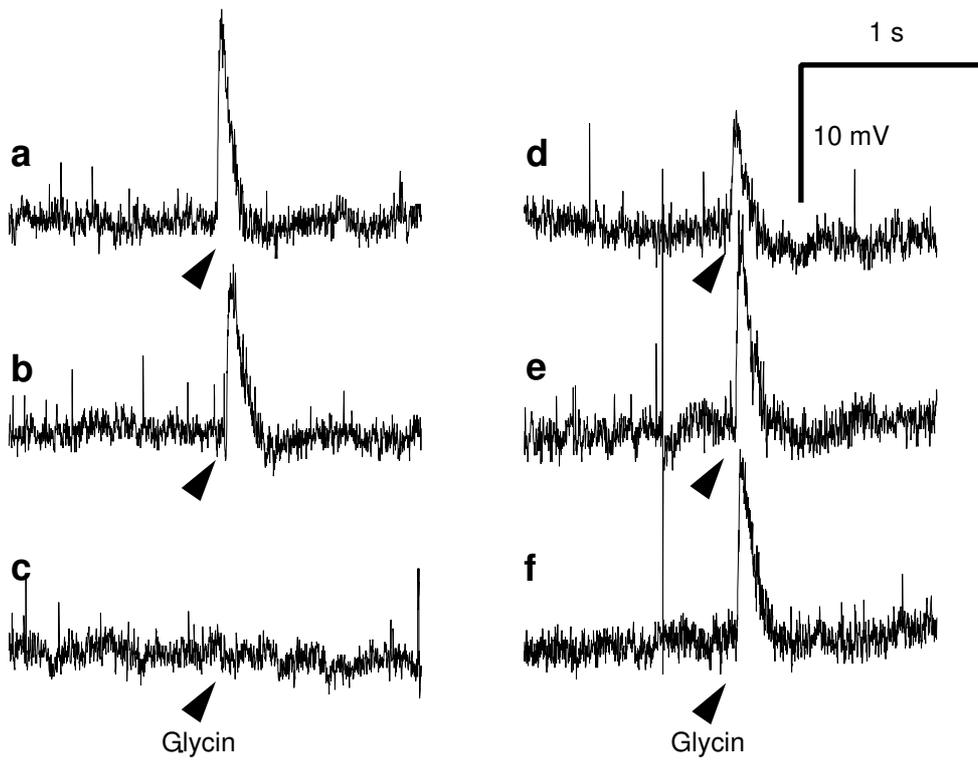


Abbildung 3.18: *Strychnin* hemmt reversibel die Wirkung der Spritzapplikation von *Glycin*. Die *Glycin*applikation (300 ms) ist jeweils durch Pfeilspitzen markiert. Links ist zuoberst die Kontrollantwort zu sehen (a). Nach 45 s Perfusion mit 300 nM *Strychnin* tritt eine teilweise Hemmung der Antwort auf (b), nach 2 min 45 s eine vollständige Blockade (c). Rechts ist die Wiederkehr der *Glycin*antwort nach einer Auswaschperiode von 4 min 45 s (d), 7 min(e) und 8 min 20 s (f) zu sehen.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Elektrophysiologie, neurochemischer Code, Funktion und Projektion

In dieser Arbeit wurden Korrelationen zwischen neurochemischem Code und Projektion der Neurone gefunden, die die Basis für polarisierte Reflexe der Magenmotorik darstellen könnten. Die Mehrheit der ChAT $\oplus$ , also der cholinergen Neurone, projizierte in orale Richtung, während NOS $\oplus$ , also nitroxiderge Neurone, zum größten Teil in anale Richtung projizierten. Zusätzlich zu diesem Ergebnis, das eine Bestätigung früherer Studien darstellt [SCHEMANN und SCHAAF 1995], konnten in dieser Arbeit ähnliche bzw. unterschiedliche Projektionsmuster für Unterpopulationen der enterischen Nervenzellen gefunden werden. Eine Aktivierung der cholinergen und nitroxidergen Populationen hätte eine oral gerichtete Erregung und eine anal gerichtete Hemmung zur Folge. Polariserte Projektionen dieser Art sind an verschiedenen Stellen des Magen-Darmkanals anzutreffen [BROOKES et al. 1991, COSTA et al. 1996] und sind im Dünndarm die Basis des peristaltischen Reflexes [COSTA und BROOKES 1994, FURNESS et al. 1995]. Ähnliche Bewegungsmuster können im Magen auftreten [LÜDERITZ 1891, SICK und TEDESKO 1908, HENNIG et al. 1997]. Auch ihre Grundlage könnte durch die beschriebenen polarisierten Projektionen gebildet werden. Diese sind außer im Korpus (in dieser Arbeit und [SCHEMANN und SCHAAF 1995]) auch im Fundus beschrieben [PFANNKUCHE et al. 1998b]. Neu ist in dieser Arbeit der Befund, daß Neurone des Magens mit der Transmitterkombination ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$  praktisch ausschließlich in orale Richtung projizierten, während NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Neurone zu mehr als 90 % descendierende Neurone waren. SP ist ein erregender Neurotransmitter, für den Rezeptoren u.a. auf der Zirkulärmuskulatur in Fundus und Antrum des Meerschweinchenmagens

nachgewiesen sind [PORTBURY et al. 1996]. Es wirkt jedoch auch auf Neurone des Meerschweinchenmagens erregend, so das eine SP $\oplus$ -Neurone sowohl Inter- als auch Motorneurone sein könnten [SCHEMANN und KAYSER 1991]. SP kann im Korpus des Meerschweinchenmagens mit Enkephalin (ENK), Somatostatin (SOM) und Calretinin (Calret) kolokalisiert sein, wobei die Gruppe mit dem neurochemischen Code ChAT/SP/ENK am häufigsten vorkommt (siehe S. 5, sowie Tabelle 2.1, S.15). Für die Gruppe der Calretinin-positiven Neurone werden in Magen und Ileum Funktionen als Motorneurone der Longitudinalmuskulatur und Interneurone diskutiert [SCHEMANN et al. 1995, COSTA et al. 1996]. Versuche mit funktionspezifischer Markierung von Mucosa- und Zirkulärmuskelneuronen erlauben im Fundus eine funktionelle Charakterisierung verschiedener neurochemischer Populationen: Die Zirkulärmuskulatur zeigt eine signifikant stärkere Innervation durch ascendierende ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$ -Neurone als die Mucosa, während descendierende ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$ -Neurone nur in geringer Zahl gefunden wurden [PFANNKUCHE et al. 1998b]. Zusätzlich wurde gezeigt, daß ENK-positive Neurone zum größten Teil Projektionen zur Zirkulärmuskulatur und nur in geringem Maße zur Mucosa haben [PFANNKUCHE et al. 1998a]. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf den Korpus und Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit würde den Schluß zulassen, daß cholinerge Motorneurone der Zirkulärmuskulatur primär ascendierende Projektion aufweisen und die Transmitterkombination ChAT/SP/ENK besitzen. Damit könnten diese Neurone die Überträger einer oral gerichteten Erregung auf die Zirkulärmuskulatur darstellen.

Applikation von NPY ruft im Meerschweinchenmagen bei 81 % der Neurone eine präsynaptische Hemmung hervor [SCHEMANN und TAMURA 1992]. Damit wirkt NPY bei mehr Neuronen präsynaptisch hemmend als Noradrenalin. Aus diesem Grund könnte man vermuten, daß NPY eine wichtige Rolle bei der Modulation interneuroner Verbindungen spielt. Dies wird durch Studien unterstützt, in denen sowohl eine durch vagale Stimulation erzeugte Kontraktion [ULMAN et al. 1995], als auch Säuresekretion im Rattenmagen durch Applikation von NPY [PENNER et al. 1993] gehemmt werden. Bei der Beurteilung der funktionellen Rolle von NPY muß beachtet werden, daß es nicht nur aus intrinsischen Quellen sondern auch aus sympathischen Nervenfasern freigesetzt werden kann [DOCKRAY 1992]. In der vorliegenden Arbeit wurden nur wenige nitroxiderge Interneurone, und damit auch nur wenige Interneurone mit der Markerkombination NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$  gefunden. Eine starke interneuronale Wirkung durch NPY aus NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Interneuronen könnte daher nur zustande kommen, wenn die Axone dieser Neurone im myen-

terischen Plexus besonders häufig verzweigen. Spezielle Innervationsmuster der  $\text{NOS}\oplus/\text{NPY}\oplus$ -Neurone wurden allerdings nicht beobachtet. Dies könnte an der Behandlung der Präparate mit Colchicin liegen, die wahrscheinlich feine Axonstrukturen besonders stark angreift. In einer vorangegangenen Studie, in der kein Colchicin benutzt wurde, wurde ein deutlich höherer Anteil von nitroxidergen Interneuronen gefunden (39 %) [SCHEMANN und SCHAAF 1995]. Auf der anderen Seite waren die Proportionen von cholinergen Inter- und Motorneuronen in dieser Studie vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit, so daß ein methodischer Fehler unwahrscheinlich scheint. Auf weitere Ergebnisse in Bezug auf eine Wirkung von NO auf Neurone wird im Kapitel über Stickoxid (Seite 68) eingegangen. Die gefundenen  $\text{NOS}\oplus/\text{NPY}\oplus$ -Motorneurone könnten, in Analogie zu Ergebnissen im Fundus [PFANNKUCHE et al. 1998b], sowohl zur Zirkulärmuskulatur als auch zur Mukosa projizieren. Hauptzellen der Mukosa besitzen NPY-Rezeptoren [RAUFMAN 1992], die hemmend auf eine stimulierte Pepsinogensekretion wirken. Damit ist auch eine direkte Wirkung von NPY an Effektorzellen in der Mukosa möglich. Eine weitere intrinsische Quelle im Magen für NPY stellt die Gruppe der  $\text{ChAT}\oplus/\text{NPY}\oplus$ -Neurone dar. Die Mukosa im Fundus erhält eine starke Innervation durch  $\text{ChAT}\oplus/\text{NPY}\oplus$ -Neurone, für die daher eine Funktion als Sekretomotor-Neurone vorgeschlagen wird [PFANNKUCHE et al. 1998b], analog zu Ergebnissen im Meerschweinchen-Ileum [FURNESS et al. 1995].

Die Einteilung der Neurone in funktionelle Klassen geschah in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit früheren Studien [SCHEMANN und SCHAAF 1995]. Neurone mit Axonterminalen in Ganglien wurden als Interneurone identifiziert, während Neurone mit Terminalen in der Muskulatur oder der Mukosa als Motorneurone angesehen wurden. Multifunktionelle Neurone zeichneten sich durch die Innervation verschiedener Zielgewebe durch Axonkollaterale aus. Die meisten der in dieser Studie gefundenen Interneurone waren cholinerg, während es sowohl cholinerge als auch nitroxiderge Motorneurone gab. Die cholinergen Interneurone projizierten darüber hinaus häufiger in anale Richtung als die cholinergen Motorneurone. Weiterhin erhielten alle untersuchten Neurone fEPSP's über synaptische Kontakte - eine Bestätigung früherer Ergebnisse [SCHEMANN und WOOD 1989b]. Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß Acetylcholin eine wichtige Rolle nicht nur bei der Erregung der Muskulatur sondern auch bei der interneuronalen Weiterleitung von Informationen im Magen spielen muß. Interneurone scheinen in Bezug auf ihre Projektionsrichtung nicht so spezialisiert zu sein wie Motorneurone. Eine durch Interneurone vermittelte Erregung würde daher ungerichtet übertragen. Für die Projektionspräferenz von Erregung und Hemmung

wären erst die Effektorneurone verantwortlich. Die funktionelle Bedeutung dieser Daten zeigen Versuche am isolierten Ratten- bzw. Meerschweinchenmagen: Nach Blockade der cholinergen interneuronalen Verbindungen durch Hexamethonium wurde nur noch eine verminderte peristaltische Aktivität beobachtet [ARMITAGE und DEAN 1966, HENNIG et al. 1997].

Motorische Aktivität kann durch einen lokalen Stimulus ausgelöst werden. Für einen Transportvorgang ist es dabei sinnvoll, daß Kontraktion bzw. Relaxation nicht am Ort des Stimulus stattfinden, sondern räumlich voneinander getrennt sind. Die in dieser Arbeit gefundenen Interneurone hatten relativ kurze Projektionsstrecken, so daß die Motorneurone für die räumliche Trennung verantwortlich sein müssen. In dieser Arbeit wurden Projektionen von ca. 2 mm für Motorneurone ermittelt. Bei Aktivierung von benachbarten ascendierenden, cholinergen und descendierenden, nitroxidergen Motorneuronen lägen Kontraktion und Relaxation daher etwa 4 mm auseinander. Häufig folgten die Axone den innervierten Muskelbäuchen noch über Strecken von mehreren Millimetern. Damit beschränkt sich die Wirkung des Motorneurons nicht nur auf einen Punkt sondern erfaßt einen größeren Bereich. Ein ähnliches Bild ergibt sich durch Studien mit dem retrograden Fluoreszenzfarbstoff DiI: Der Farbstoff wird auf ein kleines Gebiet, z.B. der Zirkulärmuskulatur, aufgebracht und von Axonen, die dieses Gebiet innervieren, retrograd zum Zellkörper transportiert. Die Schwerpunkte der descendierenden bzw. ascendierenden Neurone, die ein Stück der Zirkulärmuskulatur innervieren, liegen im Fundus des Magens ca. 3,7 mm auseinander [PFANNKUCHE et al. 1998b].

Mit dieser Arbeit konnte eine Beziehung zwischen dem neurochemischen Code und der elektrischen Erregbarkeit einiger Neuronengruppen im Magen hergestellt werden. Fast alle  $\text{NOS}^{\oplus}/\text{NPY}^{\oplus}$ -Neurone waren vom Typ Gastric-I, während  $\text{ChAT}^{\oplus}/\text{NPY}^{\oplus}$ -Neurone fast ausschließlich Gastric-II-Neurone darstellten. Für die seltenen Gastric-III Neurone ergab sich kein spezifischer neurochemischer Code. Diese Eigenschaften konnten jedoch nicht mit Funktionen der Nervenzellen als Inter- oder Motorneurone in Verbindung gebracht werden. Insbesondere konnten z.B. keine Hinweise auf intrinsische sensorische Neurone im Magen entdeckt werden. Hypothesen für solche Beziehungen wurden in anderen Teilen des Magen-Darmtraktes schon aufgestellt: Neurone, die immunreaktiv für das kalziumbindende Protein Calbindin sind, sind AH-Neurone (deren Aktionspotentiale von einer mehrere Sekunden dauernden Nachhyperpolarisation gefolgt werden) und multipolar. Ursprünglich waren an diesen Neuronen keine schnellen synaptischen Antworten (fEPSP's) nachzuweisen, so daß für sie eine Rolle als sensorische Neurone vorgeschlagen wurde [COSTA et al. 1996, NEUNLIST und SCHEMANN 1997]. Weitere

Untersuchungen zeigten jedoch, daß nicht alle AH-Neurone immunreaktiv für Calbindin sind [GERSHON et al. 1994] und daß es auch AH-Neurone mit fEPSP's gibt [BORNSTEIN et al. 1991]. Weiterhin bleibt jedoch die Möglichkeit, daß zumindest ein Teil der Calbindin/AH-Neurone eine sensorische Funktion besitzt. Obwohl sich keine klassischen Sensoren im Magen-Darmtrakt nachweisen lassen, gibt es starke Hinweise zur Existenz intrinsischer sensorischer Neurone. Dazu wurden elektrophysiologische Ableitungen von Muskelzellen des Dünndarms bei Kontrollpräparaten und extrinsisch denervierten Präparaten durchgeführt. Beide Präparationen zeigten die gleichen Reflexe bei Stimulation der Mucosa [FURNESS et al. 1995]. Die Stimulation enterischer Neurone durch mechanische oder chemische Reize der Mucosa läßt sich auch immunhistochemisch durch Nachweis der c-fos-Aktivität zeigen [KIRCHGESSNER et al. 1992]. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen jedoch auch, daß sich die Sensoren des Magen-Darmtraktes wahrscheinlich von anderen Sensoren des Nervensystems unterscheiden. So hat wahrscheinlich auch der Muskeltonus einen Einfluß auf die sensorischen Funktionen [FURNESS et al. 1998]. Vergleichbare Ergebnisse zu sensorischen Neuronen im Magen fehlen bislang. Da die vorerst angenommenen Merkmale für Sensoren im Darm (Calbindin, multipolar, AH, keine fEPSP's) im Magen fast völlig fehlen, muß angenommen werden, daß sich die sensorischen Neurone von Magen und Darm unterscheiden [SCHEMANN 1992]. Zumindest zum Teil könnten auch Axonkollaterale von afferenten sensorischen Fasern für Reflexe verantwortlich sein. So wurden afferente Fasern des N. Vagus mit Kollateralen sowohl in der Muskulatur als auch in myenterischen Ganglien des Magens der Ratte nachgewiesen. Für diese Strukturen wäre eine afferente sensorische Funktion denkbar, die über die Kollateralen im Plexus gleichzeitig einen lokalen Reflexbogen darstellt [BERTHOUD und POWLEY 1992, HENNIG et al. 1997]. Da multipolare Neurone im Magen fehlen, kämen wahrscheinlich nur Neurone mit Axonkollateralen als intrinsische sensorische Neurone in Betracht. Diese Neurone wurden in der vorliegenden Arbeit als multifunktionell bezeichnet und machten 11 % der Neurone aus. Sie zeigten jedoch keine Besonderen elektrophysiologischen, neurochemischen oder neuropharmakologischen Eigenschaften.

Neurone des Meerschweinchenmagens mit verschiedenem neurochemischen Code unterscheiden sich auch in der Größe ihrer Zellkörper [SCHEMANN und SCHAAF 1995]. Es wäre denkbar, daß dies zum bevorzugten Anstechen einer bestimmten Neuronengruppe führen könnte. Da die Anteile der Neurone mit den verschiedenen neurochemischen Codes aber gut mit Literaturdaten übereinstimmte konnte ein methodischer Fehler dieser Art weitgehend ausgeschlossen werden [SCHEMANN und SCHAAF 1995].

Allerdings ist die in dieser Arbeit gefundene Zahl von SP $\oplus$ -Neuronen deutlich kleiner als in einer vorangegangenen Studie (diese Arbeit: 22 %, [SCHEMANN und SCHAAF 1995]: 33 %). Eventuell reichte die hier verwendete Colchicinkonzentration nicht aus, um SP im Zellkörper in allen Fällen stark genug für den immunhistochemischen Nachweis anzureichern. Auf der anderen Seite zeigen neue Studien Variationen des Anteils der SP $\oplus$ -Neurone zwischen zentralem Korpus (21 %), kleiner (25 %) und großer Krümmung (33 %) (Hoppe und Schemann, unveröffentlicht). Bedingt durch die Art der Präparation wurden in der vorliegenden Arbeit meist Neurone aus dem Bereich des zentralen Korpus und der kleinen Krümmung untersucht, also dem Bereich mit niedrigen SP $\oplus$ -Zellzahlen.

Von den bisher betrachteten Eigenschaften scheinen die nitroxidergen Neurone homogenere Eigenschaften als die cholinergen Neurone zu besitzen. Elektrische Erregbarkeit und Projektion der Axone werden von der größten Untergruppe, den NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Neuronen, dominiert. Daraus folgt, daß die nitroxidergen Neurone vorwiegend Motorneurone und tonisch erregbar sind und in anale Richtung projizieren. Tonisch erregbare Gastric-I Neurone haben eine niedrigere Schwelle für die Auslösung von Aktionspotentialen als Gastric-II Neurone [SCHEMANN und WOOD 1989a]. Dies könnte bedeuten, daß sie auch unter physiologischen Bedingungen leichter erregbar sind und mehr Aktionspotentialen entladen als Gastric-II Neurone. Für diese funktionelle Deutung der elektrischen Erregbarkeit spricht auch das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, daß Neurone mit sEPSP signifikant häufiger vom Typ Gastric-I waren als Neurone ohne sEPSP. Eine Aktivierung der NOS $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Neurone sollte also einen länger anhaltenden, inhibierenden Einfluß auf die Muskulatur des Magens ausüben. Diese Vermutung wird durch Experimente am isolierten Meerschweinchenmagen unterstützt. Dort konnte gezeigt werden, daß der inhibitorische Reflex, der der adaptiven Relaxation des Magens zugrunde liegt, lang anhaltend ist und ausreicht um z.B. den Fundus komplett zu relaxieren [HENNIG et al. 1997].

Die Gruppe der cholinergen Neurone zerfällt in drei etwa gleich große Populationen: ChAT $\oplus$ /SP $\oplus$ -Neurone projizieren streng in orale Richtung und die Ergebnisse anderer Studien lassen vermuten, daß sie erregend auf die Zirkulärmuskulatur wirken. ChAT $\oplus$ /NPY $\oplus$ -Neurone sind phasisch erregbar. Für sie wird eine Rolle als Sekretomotorneurone angenommen [PFANNKUCHE et al. 1998b]. Die Gruppe der Neurone, in der keine neuronalen Marker außer ChAT nachgewiesen werden konnte, zeigte bei den untersuchten Eigenschaften keine Besonderheiten außer der primär ascendierenden Projektion.

## 4.2 Serotonin

Die hier durchgeführten Studien mit Serotonin bauten auf den pharmakologisch identifizierten Serotoninwirkungen auf [MAWE et al. 1986, SCHEMANN 1991a]. Es konnte gezeigt werden, daß 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren primär auf cholinergen, ascendierenden Neuronen lokalisiert waren. Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine Subpopulation der cholinergen 5-HT<sub>3</sub>-Neurone auch das ebenfalls erregend wirkende SP als potentiellen Neurotransmitter enthält. Eine Stimulation der Neurone mit 5-HT<sub>3</sub>-Antwort kann also sowohl Acetylcholin als auch SP freisetzen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind 5-HT<sub>3</sub>-Neurone zu 39 % Interneurone und zu 54 % Motorneurone, ihre Stimulation würde daher sowohl neuronale Schaltkreise als auch die Muskulatur in oraler Richtung direkt aktivieren.

Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Mehrheit der Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptoren nitroxiderg und descendierend ist. Der funktionelle Typ konnte nur bei wenigen 5-HT<sub>1P</sub>-Neuronen bestimmt werden. In der Gesamtpopulation waren jedoch 78 % der NOS $\oplus$ -Neurone Motorneurone. Falls diese Präferenz auch für die nitroxidergen Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub> Antwort zutrifft, würde ihre Aktivierung direkt die Muskulatur beeinflussen und sie in analer Richtung relaxieren. Wie die Gesamtheit der descendierenden Neurone, war auch die Mehrheit der descendierenden Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort tonisch erregbar. Die Relaxation des Magens bei Füllung ist ein lang anhaltender Prozeß. Es wäre daher physiologisch sinnvoll, das solche Prozesse durch Neurone gesteuert werden, die nach Stimulation langsame Antworten zeigen und hoch erregbar sind. Dafür kämen Neurone mit 5-HT<sub>1P</sub>-Antwort in Frage.

Die funktionelle Relevanz der elektrophysiologischen Daten konnte durch Motilitätsmessungen nachgewiesen werden. Dazu wurde der Einfluß von 5-HT<sub>3</sub> und 5-HT<sub>1P</sub>-Agonisten auf Zirkulärmuskelpräparate des Korpus untersucht. Der 5-HT<sub>3</sub>-Agonist vergrößerte dabei sowohl den Grundtonus der Muskulatur als auch die kontraktile Antwort bei elektrischer Feldstimulation. Der Effekt des 5-HT<sub>3</sub>-Agonisten auf den Grundtonus ließ sich durch Vorbehandlung des Gewebes mit Atropin deutlich reduzieren. Atropin wirkt nur auf die muskarinergen neuromuskulären Synapsen und nicht auf die nicotinergen interneuronalen Verbindungen. Dies bedeutet, daß der 5-HT<sub>3</sub>-Agonist einen großen Teil seiner Wirkung durch die Aktivierung cholinergischer Motorneurone entfaltet. Der Anteil der Wirkung, der nicht durch Atropin beeinflusst wird, könnte durch die Ausschüttung von SP hervorgerufen werden.

Der 5-HT<sub>1P</sub>-Agonist verminderte sowohl Grundtonus als auch die Kontraktion nach elektrischer Feldstimulation. Die Wirkung auf den Grundtonus ließ sich

durch Anwendung eines 5-HT<sub>1P</sub>-Antagonisten unterdrücken. Eine direkte Wirkung des Agonisten auf die Muskulatur ist denkbar [KUEMMERLE et al. 1992] (siehe auch S.64). Die Ergebnisse der Versuche mit elektrischer Feldstimulation zeigten jedoch, daß auch neuronale 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptoren beteiligt waren, da durch die Feldstimulation nur nervale Strukturen erregt wurden.

Die Motilitätsmessungen zeigten damit deutlich, daß Serotonin neuronal vermittelte Wirkungen auf die Zirkulärmuskulatur ausübt. Nach den elektrophysiologischen Daten würde eine Freisetzung von Serotonin auf der oralen Seite der Stimulation zu einer Ausschüttung von Acetylcholin (und teilweise SP) und damit zu einer Erregung führen. Auf analer Seite käme es durch Aktivierung nitroxiderger Neurone zur Freisetzung der hemmenden Überträgerstoffe NO und NPY. Dies könnte die Basis eines polarisierten Reflexes sein, über den Serotonin Peristaltik und Magenentleerung beeinflusst. Aufgrund früherer Studien gilt als etabliert, daß Serotonin im Darm enterische Neurone stimuliert und den peristaltischen Reflex auslösen kann [KIRCHGESSNER et al. 1992, YUAN et al. 1994, GERSHON et al. 1990]. Es steigert im Magen des Meerschweinchens die motorische Aktivität im Fundus über einen cholinerge Mechanismen, an dem wahrscheinlich 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beteiligt sind [NAKAJIMA et al. 1997]. Versuche zur Magenentleerung mit Gabe von 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Es wurden Beschleunigung [BUCHHEIT et al. 1985a], Verzögerung [STACHER et al. 1990] und keine Effekte beschrieben [MAWE et al. 1989a]. Dies könnte an unterschiedlichen Spezifitäten der verwendeten Antagonisten [GERSHON et al. 1990] sowie an den Zusammensetzungen der verwendeten Testmahlzeiten liegen. Außerdem kann Serotonin auch systemische Wirkungen hervorrufen, da auch primär afferente Nervenfasern 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren besitzen [READ und GWEE 1994]. Die Blockade von 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptoren führt bei Mäusen zu einer beschleunigten Magenentleerung, die Gabe von 5-HT<sub>1P</sub>-Agonisten zu einer verlangsamten Magenentleerung [MAWE et al. 1989a, GERSHON et al. 1990]. Diese *in vivo*-Ergebnisse zeigen, daß kontraktile Wirkungen von Serotonin häufig über Rezeptoren vom 5-HT<sub>3</sub>-Typ vermittelt werden. 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren und insbesondere 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptoren scheinen dagegen häufiger an relaxierenden Reaktionen beteiligt zu sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können dies durch eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte Acetylcholin- und/oder SP-Wirkung bzw. durch eine Ausschüttung von NO nach der Aktivierung von 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptoren erklären.

Auch bei *in vitro*-Versuchen löst Serotonin sowohl Kontraktionen als auch Relaxationen an Muskelstreifen bzw. isolierten Organen (Magen, Darmsegmente) aus. Dabei können eine direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur

und eine neuronal vermittelte Komponente unterschieden werden. Studien an einzelnen Muskelzellen des Darms (ohne nähere Angabe der Region) zeigen die Existenz von 5-HT<sub>2</sub> und 5-HT<sub>1P</sub> Rezeptoren auf der glatten Muskulatur [KUEMMERLE et al. 1992]. Der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor bewirkt eine Kontraktion, während über den 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor eine relaxierende Wirkung vermittelt wird. Wie diese beiden Rezeptoren zusammenwirken ist noch nicht geklärt.

Bei den TTX-sensitiven, also neuronal vermittelten Antworten auf Serotonin werden ebenfalls hemmende [BOGERS et al. 1991, MEULEMANS et al. 1993, BRIEJER et al. 1995b, BRIEJER et al. 1995a] und aktivierende [BUCHHEIT et al. 1985b, BUCHHEIT et al. 1985a, BUCHHEIT und BUHL 1994, WOOLLARD et al. 1994] Reaktionen beobachtet. Für die hemmenden Antworten wird NO als nicht-cholinerg nicht-adrenerger (NANC) Neurotransmitter verantwortlich gemacht. Es wird durch die Stimulation von Subtypen der 5-HT<sub>1</sub>- [MEULEMANS et al. 1993, BRIEJER et al. 1995c] oder 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren [BRIEJER et al. 1995a] freigesetzt. Die aktivierende Antwort wird wahrscheinlich durch 5-HT<sub>3</sub> und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren [BUCHHEIT und BUHL 1994, BRIEJER und SCHUURKES 1996]) vermittelt. Ihre Stimulation setzt schließlich Acetylcholin [AMEMIYA et al. 1996]) oder Acetylcholin und Substanz P (SP) frei [BUCHHEIT et al. 1985b, YAMANO und MIYATA 1996, BRIEJER und SCHUURKES 1996]. Auch diese *in vitro* Ergebnisse lassen sich zumindest teilweise auf der Basis der vorliegenden Arbeit erklären.

Der Darm stellt im Körper die größte Quelle für Serotonin dar. Es wird dort in einer kleinen Population von Neuronen des ENS [SCHEMANN et al. 1995, COSTA et al. 1996] aber in weit größerem Maße auch in den enterochromaffinen Zellen der Mukosa synthetisiert und kann von Mastzellen gespeichert und freigesetzt werden [WANG et al. 1995]. Im Magen können mechanische und chemische Stimuli, Reizung des N. Vagus oder Streß den Serotonin-Spiegel erhöhen [GERSHON et al. 1990, RACKE et al. 1990, CIURZYNSKA et al. 1994]. Verschiedene Serotoninrezeptoren konnten auf Neuronen des ENS durch elektrophysiologische Untersuchungen [GALLIGAN und NORTH 1991, SCHEMANN 1991a] und Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Antikörpern nachgewiesen werden [WADE et al. 1994]. In der vorliegenden Arbeit besaßen 76 % der Neurone im Magen Serotoninrezeptoren. Dieser großen Gruppe steht ein Anteil von 2 % der Neurone gegenüber, die Serotonin synthetisieren können [SCHEMANN et al. 1995]. Zusätzlich wurde die Freisetzung von Serotonin im Magen aus neuronalen Quellen gezeigt [BÜLBRING und GERSHON 1967]. Da keine Serotonin-immunreaktiven Axone

in der Muskulatur [SCHEMANN und SCHAAF 1995] bzw. in der Mucosa (D. Reiche, persönliche Mitteilung) gefunden wurden, könnte es sich bei diesen Neuronen um Interneurone handeln. Aufgrund der großen Diskrepanz zwischen Neuronen mit Serotoninrezeptoren und Serotonin-immunreaktiven Neuronen scheint es jedoch unwahrscheinlich, daß für die vielfältigen Wirkungen des Serotonins nur neuronales Serotonin verantwortlich gemacht werden kann. Aus der Mukosa könnte durch die oben beschriebenen Stimuli Serotonin freigesetzt werden und mukosale Axonendigungen erreichen. Diese Axonendigungen würden wie polymodale Sensoren wirken, die durch Serotonin aktiviert werden. Damit könnte Serotonin eine zentrale Rolle bei der Auslösung enterischer Reflexe spielen [GERSHON et al. 1990]. Die unterschiedlichen Wirkungen von Serotonin in den *in vitro*-Versuchen spiegeln eventuell unterschiedliche Verteilungen der Rezeptortypen in verschiedenen Regionen des Magen-Darmtraktes wieder.

### 4.3 Noradrenalin

Spritzapplikation von Noradrenalin übte sowohl erregende als auch hemmende Wirkungen auf Neurone des Magens aus. Die erregende Wirkung wurde durch  $\alpha_1$ -Rezeptoren vermittelt, während die hemmende Antwort auf präsynaptischen  $\alpha_2$ -Rezeptoren beruhte [SCHEMANN 1991b]. Weiterhin wurde bei einer Gruppe von Neuronen eine Hyperpolarisation des Membranpotentials beobachtet, die durch postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren hervorgerufen werden konnte. Die meisten Neurone mit einer präsynaptischen Hemmung durch Noradrenalin waren selbst cholinerg, ohne daß jedoch eine funktionelle Spezialisierung in Motor- oder Interneurone erkennbar war. Das bedeutet, daß Noradrenalin bei diesen Neuronen sowohl die cholinerge Erregung von Motorneuronen als auch die Weiterleitung einer Erregung über Interneurone hemmen würde. Auf der anderen Seite befanden sich in der Gruppe der Neurone, die nicht auf die Applikation von Noradrenalin reagierten, signifikant mehr Interneurone. Ein Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen würde dann den Schluß zulassen, daß primär erregende Motorneurone präsynaptisch gehemmt werden. Diese Wirkung wäre umso deutlicher, je höher der cholinerge Grundtonus liegt. *In-vivo* Experimente an Ratten [ASAI et al. 1997]), Katzen [FANDRIKS 1986, FANDRIKS und JONSON 1987, FANDRIKS et al. 1987]) und Meerschweinchen belegen einen inhibierenden Einfluß auf Magenmotilität und Sekretionsvorgänge bei Stimulation des (sympathischen) N. splanchnicus bzw. bei Gabe von Noradrenalin oder Noradrenalin-Agonisten. Diese Wirkung wurde hauptsächlich durch  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermittelt, wobei in diesen Experimen-

ten nicht entschieden werden konnte, ob es sich um prä- oder postsynaptisch lokalisierte Rezeptoren handelte. Die inhibierende Wirkung von Noradrenalin war jedoch stärker, wenn ein hoher cholinerg Tonus vorhanden war. Mit den oben angeführten Ergebnissen kann geschlossen werden, daß Noradrenalin cholinerge Übertragungsmechanismen moduliert (als Übersicht siehe [ROMAN und GONELLA 1994]). Den stärkeren Einfluß würde Noradrenalin auf Motorneurone ausüben und weniger auf Interneurone.

Die Rolle der Neurone mit  $\alpha_1$ -Rezeptoren bleibt auch nach den vorliegenden Ergebnissen unklar. Sie zeigten keine Präferenz für eine bestimmte Funktionsklasse, neurochemischen Code oder Projektionsrichtung. Insbesondere sind sie sowohl auf cholinergen als auch auf nitroxidergen Neuronen lokalisiert. Noradrenalin würde also durch  $\alpha_1$ -Rezeptoren sowohl aktivierend als auch hemmend wirken. Experimente mit Muskelstreifen vom Korpus des Meerschweinchenmagens zeigten eine Verminderung des Basistonus durch den  $\alpha_1$ -Agonisten L-phenylephrin [HILLSLEY et al. 1992]. Dagegen hatte ein  $\alpha_2$ -Agonist eine sehr schwache Erhöhung des Basistonus zur Folge. In der gleichen Studie wurden auch die Wirkungen der Agonisten bei elektrischer Feldstimulation untersucht. Die prinzipielle Antwort auf die Stimulation bestand aus einer Kontraktion während der Dauer der Stimulation die cholinerg vermittelt ist, einer darauf folgenden zweiten Kontraktionsperiode und schließlich einer Relaxation. Der  $\alpha_1$ -Agonist verstärkte die erste und schwächte die zweite Kontraktion und vergrößerte die Relaxation. Der  $\alpha_2$ -Agonist inhibierte die initiale Kontraktion ohne die anderen Teile der Antwort zu beeinflussen. Da die  $\alpha_1$ -Wirkung sowohl cholinerge als auch nitroxiderge Motorneurone aktiviert, würde dies die sowohl kontraktile als auch relaxierende Wirkung des Agonisten erklären.

Es ist auffällig, daß vorhergehende Studien im Magen keine Hyperpolarisation als Antwort auf die Gabe von Noradrenalin zeigten [SCHEMANN 1991b, TACK und WOOD 1992]. Eine solche Reaktion wurde in der vorliegenden Arbeit immerhin bei 10 % der Neurone beobachtet, ohne daß jedoch der Rezeptortyp ermittelt wurde. Im Dünndarm wurden sowohl präsynaptische als auch postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren [NORTH und SURPRENANT 1985, GALLIGAN und NORTH 1991] nachgewiesen. Der postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptor bewirkt bei Applikation von Noradrenalin eine Hyperpolarisation der Zellmembran durch Aktivierung der Kaliumleitfähigkeit [NORTH und SURPRENANT 1985]. Dabei wird die Erregbarkeit der Zelle herabgesetzt. Daher wird vermutet, daß der postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptor eventuell für inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP's) verantwortlich ist [NORTH und SURPRENANT 1985]. Aus Vergleichen mit diesen Ergebnissen könnte vermutet werden, daß die Hyperpolarisation durch Noradrenalin auch

im Magen durch postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermittelt wird. In diesem Fall würde man bei einer Stimulation noradrenerger Fasern IPSP's auch im Magen erwarten. Im Korpus des Magens wurden jedoch weder in dieser noch in früheren Studien IPSP's beobachtet [SCHEMANN und WOOD 1989b]. Im Antrum kommen IPSP's sehr selten vor [TACK und WOOD 1992]. Dieser Befund könnte von einer experimentellen Schwierigkeit herrühren: Bei der Stimulation eines Faserstranges durch eine Reizelektrode werden sowohl cholinerge als auch noradrenerge Fasern stimuliert. Wenn die Dichte der cholinergen Fasern größer als die der noradrenergen Fasern ist, wäre die cholinerge Wirkung stärker. In dieser Studie wurden allerdings keine Untersuchungen zu einer pharmakologischen Differenzierung der einzelnen Komponenten der neural vermittelten intrinsischen Antworten vorgenommen.

Noradrenalin ist der Haupttransmitter der postganglionären Neurone des Sympathikus. Die sympathische Innervation des Magens erfolgt über das Ganglion coeliacum. Die meisten der von dort kommenden noradrenergen Fasern versorgen die Ganglien des myenterischen Plexus und Blutgefäße, nur wenige Fasern lassen sich in der Muskulatur nachweisen [FURNESS und COSTA 1974, MAWE et al. 1989b]. Dies deutet auf eine Wirkung von Noradrenalin als extrinsischen Modulator des ENS hin. Es stellt sich jedoch die Frage, ob Noradrenalin auch von intrinsischen Neuronen des ENS freigesetzt werden kann. Es wird aus Tyrosin über Zwischenschritte, für die die Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- $\beta$ -hydroxylase (DBH) nötig sind, synthetisiert. Im myenterischen Plexus des Meerschweinchenmagens läßt sich in einer Subpopulation von Neuronen das Enzym DBH nachweisen (diese Arbeit und [SCHEMANN et al. 1995]). In diesen Neuronen fehlt jedoch Tyrosinhydroxylase [MAWE et al. 1989b, SCHEMANN et al. 1995], so daß es eher unwahrscheinlich ist, daß sie Noradrenalin synthetisieren können. Eine ähnliche Situation findet sich in der Gallenblase des Meerschweinchens [MAWE und GERSHON 1989], dort konnte in solchen Neuronen keine endogenen Katecholamine nachgewiesen werden. Damit würde die noradrenerge Innervation des Magens ganz oder zum größten Teil vom Sympathikus herrühren.

Eine Reizung des Sympathikus bewirkt im Magen-Darmtrakt allgemein eine Motilitätsabnahme und eine Aktivierung der Sphincteren. Diese Reaktionen werden über eine Wirkung von Noradrenalin auf Neurone und direkt auf die Muskulatur ausgeübt. Für den Magen könnte nach der vorliegenden Arbeit die neuronal vermittelte Wirkung des Sympathikus durch die präsynaptische Hemmung von cholinergen Motorneuronen erklärt werden.

## 4.4 Stickoxid

In der vorliegenden Studie beeinflusste exogenes NO nur in einer Minderheit von Neuronen fEPSP's, die durch elektrische Stimulation interganglionärer Faserstränge ausgelöst wurden. Ein Einfluß auf sEPSP's wurde nicht beobachtet. Dies ist ein Unterschied zu Befunden im Dünndarm des Meerschweinchens: Dort wurden fEPSP's durch NO nicht beeinflusst, sEPSP's wurden jedoch bei der Mehrheit der Neuronen unterdrückt [TAMURA et al. 1993]. Die elektrophysiologischen Befunde der vorliegenden Arbeit waren konsistent mit den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen: Die meisten der nitroxidergen Neurone wurden als Motorneurone identifiziert, während die Mehrheit der Interneurone im Magen cholinerg war. Eine ähnliche Situation wurde im myenterischen Plexus des Meerschweinchen-Ileums gefunden. Dort werden cholinerge Interneurone, cholinerge und nitroxiderge Motorneurone aber nur eine Minderheit von nitroxidergen Interneuronen beschrieben [COSTA et al. 1996]. Dies würde bedeuten, daß NO im Magen für die interneuronale Erregungsübertragung eine untergeordnete Rolle spielt und seine Hauptwirkung an der glatten Muskulatur entfaltet. Es bewirkt über Zwischenschritte eine Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration und eine Relaxation der Muskulatur.

Im Magen wird NO als Überträgerstoff der neuromuskulären Synapse sowohl bei der rezeptiven als auch bei der adaptiven Relaxation [DESAI et al. 1991b, DESAI et al. 1991a] diskutiert. Bei der adaptiven Relaxation entspannt sich der Fundus des Magens in Antwort auf den Reiz einer langsamen Füllung. Durch Versuche am isolierten Magen des Meerschweinchens konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um eine TTX-sensitive, nicht-cholinerge, nicht adrenerge (NANC) Reaktion handelt, die nicht von einer extrinsischen Innervation abhängt. Die Abhängigkeit von einer intrinsischen ganglionären Übertragung wird widersprüchlich beschrieben: Zum einen wird eine Beeinflussung der Reaktion durch Hexamethonium beschrieben [HENNIG et al. 1997] während andere Autoren eine solche Beeinflussung nicht finden [DESAI et al. 1991a, UNO et al. 1997]. Adaptive Relaxation läßt sich jedoch durch Inhibitoren der NO-Synthase unterdrücken [DESAI et al. 1991a, UNO et al. 1997]. Daher muss NO in dieser Reaktion involviert sein. Sie beruht wahrscheinlich auf einem lokalen Reflex, der durch einen Druck- oder Dehnungsrezeptor in der Magenwand ausgelöst wird und wahrscheinlich zum Teil von einer cholinergen ganglionären Übertragung unabhängig ist. Die Art des Sensors ist im Magen jedoch noch nicht geklärt (siehe Seite 60).

Durch die rezeptive Relaxation wird ebenfalls der Fundus relaxiert, wenn Nahrung Pharynx und Ösophagus passiert. Im Gegensatz zur adaptiven Relaxation

ist sie abhängig von einer vagalen Innervation des Magens und wird durch eine Blockade der ganglionären Übertragung im Magen unterdrückt. Sie ist aber ebenfalls von der NO-Synthese abhängig [DESAI et al. 1991b]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß keine elektrophysiologische, neurochemische oder funktionelle Gruppe von Neuronen durch den N. Vagus bevorzugt innerviert wurde. Dies würde bedeuten, daß durch Vagusstimulation sowohl erregende als auch hemmende Mechanismen in Gang gesetzt werden. Auch hier gilt wieder, daß die größte Gruppe der nitroxidergen Neurone, die  $\text{NOS}\oplus/\text{NPY}\oplus$ -Neurone, gleichzeitig hoch erregbar sind und daher die Vermittler einer länger dauernden Wirkung sein könnten.

Eine Wirkung von NO auf Neurone des Magens kann jedoch nach diesen Studien nicht ausgeschlossen werden. In einer Studie am Meerschweinchenmagen wurde ein höherer Anteil nitroxiderge Interneurone [SCHEMANN und SCHAAF 1995, SCHAAF 1995] als in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. In einer weiteren Studie wurde die Verteilung von nitroxidergen Neuronen und Axonterminalen im Gastrointestinaltrakt des Meerschweinchens untersucht [FURNESS et al. 1994]. Im Magen wurde dabei eine starke nitroxiderge Innervation der Zirkulärmuskulatur gefunden, aber nur wenige Axonterminale in der Longitudinalmuskulatur und in den Ganglien des myenterischen Plexus. Die Verfasser der Studie schlossen daraus, daß nitroxiderge Neurone im Magen vorwiegend inhibitorische Neurone der Zirkulärmuskulatur sind und keine Rolle als Interneurone spielen. Auf der anderen Seite zeigte die vorliegende Arbeit, daß die meisten der nitroxidergen Neurone des Magens NPY als Kotransmitter besitzen. Wie schon vorher dargestellt (s.S. 57) wirkt NPY bei der Mehrheit der Neurone des Magens präsynaptisch inhibierend. Damit könnte ein Teil dieser NO/NPY-Neurone auch hemmende Interneurone darstellen, deren Wirkung durch NPY und nicht durch NO vermittelt würde.

## 4.5 Glycin

Glycin zeigte an 26 % der untersuchten Neurone eine schnelle, depolarisierende Wirkung. Diese Wirkung ließ sich durch Strychnin reversibel blockieren. Daher ist es wahrscheinlich, daß sie über den Glycinrezeptor vermittelt wurde, und nicht auf der strychninunempfindlichen Glycinwirkung am NMDA-Rezeptor beruhte. Das Umkehrpotential dieses Effektes lag zwischen -30 mV und -10 mV. Der strychninempfindliche Glycinrezeptor ist ein ligandengekoppelter Chloridkanal. Sind keine weiteren Kanäle beteiligt, so läßt sich aus dem ermittelten Umkehrpotential die intrazelluläre Chlorid-Ionenkonzentration berechnen. Bei einer  $\text{Cl}^-$ -Konzentration in der Krebslösung von 127 mM, ergibt sich eine in-

trazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Konzentration von ca. 26 mM. Dies ist höher als z.B für Neurone des ZNS angegeben (ca. 5 mM), bei denen das  $\text{Cl}^-$ -Umkehrpotential in der Nähe des  $\text{K}^+$ -Ionen Gleichgewichtspotentials liegt. Dort bewirkt ein öffnen der  $\text{Cl}^-$ -Kanäle eine Hyperpolarisation der Zellmembran und eine Senkung der Erregbarkeit. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von  $\text{Cl}^-$ -Ionen war die Verminderung der Glycinwirkung bei Blockade des  $\text{Cl}^-$ -Transporters durch Furosemid. Auch im Dünndarm des Meerschweinchens (myenterischer Plexus) wurde ein depolarisierender Effekt bei Perfusion von Glycin beschrieben [MAYER et al. 1982]. Die Autoren nahmen dort an, daß in diesen Neuronen das  $\text{Cl}^-$ -Gleichgewichtspotential bei -30 mV- -50 mV liegt, was ebenfalls einer höheren  $\text{Cl}^-$  Konzentration als in Neuronen des ZNS entsprechen würde.

Glycin ist neben  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) einer der wichtigsten hemmenden Neurotransmitter des Zentralnervensystems. Es kommt z.B. in den Renshaw-Zellen des Rückenmarks vor, ist aber bislang nicht in Neuronen des enterischen Nervensystems nachgewiesen. Dagegen sind GABA-Neurone auch im ENS nachgewiesen und beim Meerschweinchen hemmt GABA die Ausschüttung von Neurotransmittern an der neuromuskulären Verbindung [HILLS und JESSEN 1992]. Eine strychninsensitive erregende Wirkung von Glycin wurde bislang außer in der schon erwähnten Arbeit nur in embryonalen Motorneuronen im Rückenmark von Ratten gefunden [NISHIMARU et al. 1996]. Diese Wirkung verschwand noch während der Embryonalentwicklung. Der Gastrointestinaltrakt stellt damit das bislang einzige Beispiel für eine erregende Wirkung von Glycin in einem adulten Nervensystem dar.

Glycin ist in vielen Nahrungsmitteln, im Blut [CIBA-GEIGY 1984] und im Magensaft vorhanden, wobei eine Erhöhung des Glycinspiegels bei Sekretion von saurem Magensaft nachgewiesen wurde [CIBA-GEIGY 1981]. In *in vivo* Versuchen an Ratten hat Glycin eine gastroprotektive und sekretionsmindernde Wirkung [LIGUMSKY et al. 1995, TARIQ und AL MOUTAERY 1997]. Es vermindert die schädigende Wirkung von Ethanol [LIGUMSKY et al. 1995] und hemmt die Ethanolaufnahme durch den Gastrointestinaltrakt bei Mäusen [AKAO und KOBASHI 1995]. Weiterhin ist bei Ratten eine Verstärkung der Pepsinsekretion im Magen nach Applikation von Glycin nachgewiesen [AONO et al. 1981a]. Die Mechanismen, über die diese Effekte erzielt werden, sind noch unklar. Bei der Wirkung auf die Pepsinsekretion sind nervale Strukturen beteiligt, da eine Atropininfusion die Glycinwirkung vermindert [AONO et al. 1981b]. Nach den nun vorliegenden Ergebnissen wäre eine Wirkung von Glycin auf Neurone des myenterischen Plexus bzw. auf Axonterminale in der Mukosa möglich. Dadurch könnten lokale Schaltkreise zur Adaption des Magens in Gang gesetzt werden. Zum Nachweis der funktionellen Relevanz der

elektrophysiologischen Daten sind allerdings noch weitere Versuche notwendig. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß diese Arbeit neue Hinweise auf eine differentielle Beeinflussung von cholinergen und nitroxidergen Neuronenpopulationen im Korpus des Meerschweinchenmagens durch verschiedene Neurotransmitter liefert. Weiterhin wurden Anhaltspunkte für eine funktionelle bzw. neurochemische Spezialisierung einzelner Neuronengruppen gefunden. Die Innervation des Magens zeigt dabei deutliche Unterschiede zu anderen Teilen des Magen-Darmtraktes. Diese Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis von Funktionen bzw. Dysfunktionen des Magens beitragen. Die selektive Beeinflussung bestimmter neuronaler Rezeptoren könnte neue Ansatzpunkte zur Behandlung von Störungen der Magenmotilität liefern.

# Literaturverzeichnis

- [AKAO und KOBASHI 1995] AKAO, T. und K. KOBASHI (1995). *Inhibitory effect of glycine on ethanol absorption from gastrointestinal tract*. Biol Pharm Bull, 18(12):1653–1656.
- [AMEMIYA et al. 1996] AMEMIYA, N., S. HATTA, H. TAKEMURA und H. OHSHIKA (1996). *Characterization of the contractile response induced by 5-methoxytryptamine in rat stomach fundus strips*. Eur J Pharmacol, 318(2-3):403–409.
- [AONO et al. 1981a] AONO, M., M. MORIGA, Y. IWASAKI und H. UCHINO (1981a). *Effect of topical application of amino acids on gastric pepsin secretion in the rat. Part III: effect of L- and D-isomers of amino acids on gastric secretion in reperfusion system*. Gastroenterol Jpn, 16(4):326–330.
- [AONO et al. 1981b] AONO, M., M. MORIGA und H. UCHINO (1981b). *Effect of topical application of amino acids on gastric pepsin secretion in the rat*. Gastroenterol Jpn, 16(2):100–109.
- [ARMITAGE und DEAN 1966] ARMITAGE, A.K. und A. DEAN (1966). *The Effects of Pressure and Pharmacologically Active Substances on Gastric Peristalsis in a Transmurally Stimulated Rat Stomach-Duodenum Preparation*. J. Physiol. (London), 182:42–56.
- [ASAI et al. 1997] ASAI, T., M. VICKERS und I. POWER (1997). *Clonidine inhibits gastric motility in the rat*. Eur J Anaesthesiol, 14(3):316–319.
- [BAYLISS und STARLING 1899] BAYLISS, W.M. und E. STARLING (1899). *The movement and innervation of the small intestine*. J Physiol, 24:99–143.
- [BERTHOUD et al. 1991a] BERTHOUD, H.R., N. CARLSON und T. POWLEY (1991a). *Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract*. Am J Physiol, 260(1 Pt 2):R200–7.

- [BERTHOUD et al. 1991b] BERTHOUD, H.R., E. FOX und T. POWLEY (1991b). *Abdominal pathways and central origin of rat vagal fibers that stimulate gastric acid*. *Gastroenterology*, 100(3):627–637.
- [BERTHOUD und POWLEY 1992] BERTHOUD, H.R. und T. POWLEY (1992). *Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor*. *J Comp Neurol*, 319(2):261–276.
- [BOGERS et al. 1991] BOGERS, J.J., P. PELCKMANS, G. BOECKXSTAENS, J. DE MAN, A. HERMAN und Y. VAN MAERCKE (1991). *The role of nitric oxide in serotonin-induced relaxations in the canine terminal ileum and ileocolonic junction*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 344(6):716–719.
- [BORNSTEIN und FURNESS 1988] BORNSTEIN, J.C. und J. FURNESS (1988). *Correlated electrophysiological and histochemical studies of submucous neurons and their contribution to understanding enteric neural circuits*. *J Auton Nerv Syst*, 25(1):1–13.
- [BORNSTEIN et al. 1994] BORNSTEIN, J.C., J. FURNESS und W. KUNZE (1994). *Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate?*. *J Auton Nerv Syst*, 48(1):1–15.
- [BORNSTEIN et al. 1991] BORNSTEIN, J.C., J. FURNESS, T. SMITH und D. TRUSSELL (1991). *Synaptic responses evoked by mechanical stimulation of the mucosa in morphologically characterized myenteric neurons of the guinea-pig ileum*. *J Neurosci*, 11(2):505–518.
- [BRIEJER et al. 1995a] BRIEJER, M.R., L. AKKERMANS, R. LEFEBVRE und J. SCHUURKES (1995a). *Novel 5-HT<sub>2</sub>-like receptor mediates neurogenic relaxation of the guinea-pig proximal colon*. *Eur J Pharmacol*, 279(2-3):123–133.
- [BRIEJER et al. 1995b] BRIEJER, M.R., L. AKKERMANS, A. MEULEMANS, R. LEFEBVRE und J. SCHUURKES (1995b). *5-HT-induced neurogenic relaxations of the guinea-pig proximal colon: investigation into the role of ATP and VIP in addition to nitric oxide*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 351(2):126–135.
- [BRIEJER und SCHUURKES 1996] BRIEJER, M.R. und J. SCHUURKES (1996). *5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors and cholinergic and tachykininergic neurotransmission in the guinea-pig proximal colon*. *Eur J Pharmacol*, 308(2):173–180.
- [BRIEJER et al. 1995c] BRIEJER, M.R., G. VEEN, L. AKKERMANS, R. LEFEBVRE und J. SCHUURKES (1995c). *Cisapride and structural analogs selectively*

- enhance 5-hydroxytryptamine (5-HT)-induced purinergic neurotransmission in the guinea pig proximal colon.* J Pharmacol Exp Ther, 274(2):641–648.
- [BRODIN et al. 1983] BRODIN, E., K. SJOLUND, R. HAKANSON und F. SUNDLER (1983). *Substance P-containing nerve fibers are numerous in human but not in feline intestinal mucosa.* Gastroenterology, 85(3):557–564.
- [BROOKES et al. 1991] BROOKES, S.J., P. STEELE und M. COSTA (1991). *Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine.* Neuroscience, 42(3):863–878.
- [BUCHHEIT und BUHL 1994] BUCHHEIT, K.H. und T. BUHL (1994). *Stimulant effects of 5-hydroxytryptamine on guinea pig stomach preparations in vitro.* Eur J Pharmacol, 262(1-2):91–97.
- [BUCHHEIT et al. 1985a] BUCHHEIT, K.H., B. COSTALL, G. ENGEL, S. GUNNING, R. NAYLOR und B. RICHARDSON (1985a). *5-Hydroxytryptamine receptor antagonism by metoclopramide and ICS 205-930 in the guinea-pig leads to enhancement of contractions of stomach muscle strips induced by electrical field stimulation and facilitation of gastric emptying in-vivo.* J Pharm Pharmacol, 37(9):664–667.
- [BUCHHEIT et al. 1985b] BUCHHEIT, K.H., G. ENGEL, E. MUTSCHLER und B. RICHARDSON (1985b). *Study of the contractile effect of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the isolated longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. Evidence for two distinct release mechanisms.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 329(1):36–41.
- [BÜLBRING und GERSHON 1967] BÜLBRING, E. und M. GERSHON (1967). *5-hydroxytryptamine participation in the vagal inhibitory innervation of the stomach.* J Physiol Lond, 192(3):823–846.
- [CHERUBINI und NORTH 1984a] CHERUBINI, E. und R. NORTH (1984a). *Actions of gamma-aminobutyric acid on neurones of guinea-pig myenteric plexus.* Br J Pharmacol, 82(1):93–100.
- [CHERUBINI und NORTH 1984b] CHERUBINI, E. und R. NORTH (1984b). *Inhibition of calcium spikes and transmitter release by gamma-aminobutyric acid in the guinea-pig myenteric plexus.* Br J Pharmacol, 82(1):101–105.
- [CIBA-GEIGY 1981] CIBA-GEIGY (1981). *Units of Measurement, Body Fluids, Composition of the Body, Nutrition*, Bd. 1 d. Reihe Geigy Scientific Tables. Ciba-Geigy Limited.

- [CIBA-GEIGY 1984] CIBA-GEIGY (1984). *Physical Chemistry, Composition of Blood, Hematology, Somatometric Data*, Bd. 3 d. Reihe *Geigy Scientific Tables*. Ciba-Geigy Limited.
- [CIURZYNSKA et al. 1994] CIURZYNSKA, G., J. DZIERZKOWSKA und S. MASLINSKI (1994). *Gastric cytoprotective activity of endogenous 5-HT*. *J Physiol Pharmacol*, 45(4):517–532.
- [COSTA und BROOKES 1994] COSTA, M. und S. BROOKES (1994). *The enteric nervous system*. *Am J Gastroenterol*, 89(8 Suppl):S129–37.
- [COSTA et al. 1996] COSTA, M., S. BROOKES, P. STEELE, I. GIBBINS, E. BURCHER und C. KANDIAH (1996). *Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum*. *Neuroscience*, 75(3):949–967.
- [COSTA et al. 1992a] COSTA, M., S. BROOKES, S. WATERMAN und R. MAYO (1992a). *Enteric Neuronal Circuitry and Transmitters Controlling Intestinal Motor Functions*. In: HOLLE, G. und J. WOOD, Hrsg.: *Advances in the Innervation of the Gastrointestinal Tract*, S. 115–121. Elsevier, Amsterdam.
- [COSTA et al. 1992b] COSTA, M., J. FURNESS, S. POMPOLO, S. BROOKES, J. BORNSTEIN, D. BREDT und S. SNYDER (1992b). *Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine*. *Neurosci Lett*, 148(1-2):121–125.
- [DESAI et al. 1991a] DESAI, K.M., W. SESSA und J. VANE (1991a). *Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid*. *Nature*, 351(6326):477–479.
- [DESAI et al. 1991b] DESAI, K.M., A. ZEMBOWICZ, W. SESSA und J. VANE (1991b). *Nitroergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24):11490–11494.
- [DOBREVA et al. 1998] DOBREVA, G., M. NEUNLIST, T. FRIELING und M. SCHEMANN (1998). *Post- and presynaptic effects of norepinephrine in guinea-pig colonic submucous plexus*. *Neurogastroenterol Motil*, 10(2):123–130.
- [DOCKRAY 1992] DOCKRAY, G. J. (1992). *Transmission: Peptides*. In: BURNSTOCK, G. und C. HOYLE, Hrsg.: *Autonomic Neuroeffector Mechanisms*, Bd. 1 d. Reihe *The Autonomic Nervous System*, S. 409–464. Harwood Academic Publishers, 1 Aufl.

- [FANDRIKS 1986] FANDRIKS, L. (1986). *Vagal and splanchnic neural influences on gastric and duodenal bicarbonate secretions. An experimental study in the cat.* Acta Physiol Scand Suppl, 555:1–39.
- [FANDRIKS und JONSON 1987] FANDRIKS, L. und C. JONSON (1987). *Effects of adrenoceptor antagonists on vagally induced gastric and duodenal HCO<sub>3</sub>-secretions in the cat.* Acta Physiol Scand, 130(2):243–249.
- [FANDRIKS et al. 1987] FANDRIKS, L., C. JONSON und O. NYLANDER (1987). *Effects of splanchnic nerve stimulation and of clonidine on gastric and duodenal HCO<sub>3</sub>-secretion in the anaesthetized cat.* Acta Physiol Scand, 130(2):251–258.
- [FURNESS et al. 1998] FURNESS, J. B., W. A. A. KUNZE, P. P. BERTRAND, N. CLERC und J. C. BORNSTEIN (1998). *Intrinsic Primary Afferent Neurons of the Intestine.* Prog-Neurobiol., 54:1–18.
- [FURNESS und COSTA 1974] FURNESS, J.B. und M. COSTA (1974). *The adrenergic innervation of the gastrointestinal tract.* Ergeb Physiol, 69:2–51.
- [FURNESS et al. 1994] FURNESS, J.B., Z. LI, H. YOUNG und U. FORSTERMANN (1994). *Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description.* Cell Tissue Res, 277(1):139–149.
- [FURNESS et al. 1991] FURNESS, J.B., K. LLOYD, C. STERNINI und J. WALSH (1991). *Evidence that myenteric neurons of the gastric corpus project to both the mucosa and the external muscle: myectomy operations on the canine stomach.* Cell Tissue Res, 266(3):475–481.
- [FURNESS et al. 1995] FURNESS, J.B., H. YOUNG, S. POMPOLO, J. BORNSTEIN, W. KUNZE und K. MCCONALOGUE (1995). *Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract.* Gastroenterology, 108(2):554–563.
- [GALLIGAN und NORTH 1991] GALLIGAN, J.J. und R. NORTH (1991). *Opioid, 5-HT<sub>1A</sub> and alpha 2 receptors localized to subsets of guinea-pig myenteric neurons.* J Auton Nerv Syst, 32(1):1–11.
- [GERSHON et al. 1994] GERSHON, M.D., A. L. KIRCHGESSNER und P. R. WADE (1994). *Functional Anatomy of the Enteric Nervous System.* In: JOHNSON, L.R., Hrsg.: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Bd. 1, Kap. 9, S. 381–422. Raven Press, New York, 3 Aufl.

- [GERSHON et al. 1990] GERSHON, M.D., P. WADE, A. KIRCHGESSNER und H. TAMIR (1990). *5-HT receptor subtypes outside the central nervous system. Roles in the physiology of the gut*. *Neuropsychopharmacology*, 3(5-6):385–395.
- [GOYAL und HIRANO 1996] GOYAL, R.K. und I. HIRANO (1996). *The enteric nervous system*. *N Engl J Med*, 334(17):1106–1115.
- [GRUNDY und SCHEMANN 1992] GRUNDY, D. und M. SCHEMANN (1992). *Neurology of the Stomach*. In: GUSTAFFSON, S., D. KUMAR und D. GRAHAM, Hrsg.: *The Stomach*, S. 21–40. Churchill Livingstone, New York.
- [HASHMONAI et al. 1987] HASHMONAI, M., V. GO und J. SZURSZEWski (1987). *Effect of total sympathectomy and of decentralization on migrating complexes in dogs*. *Gastroenterology*, 92(4):978–986.
- [HENNIG et al. 1997] HENNIG, G.W., S. BROOKES und M. COSTA (1997). *Excitatory and inhibitory motor reflexes in the isolated guinea-pig stomach*. *J Physiol Lond*, 501(Pt 1):197–212.
- [HILLE 1992] HILLE, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc., 2 Aufl.
- [HILLS und JESSEN 1992] HILLS, J.M. und K. JESSEN (1992). *Transmission:  $\gamma$ -Aminobutyricacid (GABA), 5-HydroxyTryptamine (5-HT) and Dopamine*. In: BURNSTOCK, G. und C. HOYLE, Hrsg.: *Autonomic Neuroeffector Mechanisms*, Bd. 1 d. Reihe *The Autonomic Nervous System*, S. 465–507. Harwood Academic Publishers, 1 Aufl.
- [HILLSLEY et al. 1992] HILLSLEY, K., M. SCHEMANN und D. GRUNDY (1992). *Alpha-adrenoreceptor modulation of neurally evoked circular muscle responses of the guinea pig stomach*. *J Auton Nerv Syst*, 40(1):57–62.
- [HIRST et al. 1985a] HIRST, G.D., S. JOHNSON und D. VAN HELDEN (1985a). *The calcium current in a myenteric neurone of the guinea-pig ileum*. *J Physiol Lond*, 361:297–314.
- [HIRST et al. 1985b] HIRST, G.D., S. JOHNSON und D. VAN HELDEN (1985b). *The slow calcium-dependent potassium current in a myenteric neurone of the guinea-pig ileum*. *J Physiol Lond*, 361:315–337.
- [KIRCHGESSNER et al. 1992] KIRCHGESSNER, A.L., H. TAMIR und M. GERSHON (1992). *Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity*. *J Neurosci*, 12(1):235–248.

- [KUEMMERLE et al. 1992] KUEMMERLE, J.F., D. MARTIN, K. MURTHY, J. KELLUM, J. GRIDER und G. MAKHLOUF (1992). *Coexistence of contractile and relaxant 5-hydroxytryptamine receptors coupled to distinct signaling pathways in intestinal muscle cells: convergence of the pathways on Ca<sup>2+</sup> mobilization*. Mol Pharmacol, 42(6):1090–1096.
- [LANGLEY 1921] LANGLEY, J.N. (1921). *The Autonomic Nervous System*, Bd. 1. W. Heffer and Sons, Cambridge.
- [LANGLEY und MAGNUS 1905] LANGLEY, J.N. und R. MAGNUS (1905). *Some Observations of Movements of the Intestine Before and After Degenerative Section of the Mesenteric Nerves*. J Physiol, 33:34–51.
- [LIGUMSKY et al. 1995] LIGUMSKY, M., M. SESTIERI, E. OKON und I. GINSBURG (1995). *Antioxidants inhibit ethanol-induced gastric injury in the rat. Role of manganese, glycine, and carotene*. Scand J Gastroenterol, 30(9):854–860.
- [LINCOLN et al. 1992] LINCOLN, J., C. HOYLE und G. BURNSTOCK (1992). *Transmission: Nitric Oxide*. In: BURNSTOCK, G. und C. HOYLE, Hrsg.: *Autonomic Neuroeffector Mechanisms*, Bd. 1 d. Reihe *The Autonomic Nervous System*, S. 509–539. Harwood Academic Publishers, 1 Aufl.
- [LIU et al. 1997] LIU, M.T., J. ROTHSTEIN, M. GERSHON und A. KIRCHGESNER (1997). *Glutamatergic enteric neurons*. J Neurosci, 17(12):4764–4784.
- [LÜDERITZ 1891] LÜDERITZ, C. (1891). *Das motorische Verhalten des Magens bei Reizung seiner Äußeren Fläche*. Archiv für die gesamte Physiologie, 49:158–174.
- [MAGNUS 1908] MAGNUS, R. (1908). *Die Bewegungen des Verdauungskanal*. Ergebnisse Physiologie, 7:27–64.
- [MAWE et al. 1986] MAWE, G.M., T. BRANCHEK und M. GERSHON (1986). *Peripheral neural serotonin receptors: identification and characterization with specific antagonists and agonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, 83(24):9799–9803.
- [MAWE et al. 1989a] MAWE, G.M., T. BRANCHEK und M. GERSHON (1989a). *Blockade of 5-HT-mediated enteric slow EPSPs by BRL 24924: gastrokinetic effects*. Am J Physiol, 257(3 Pt 1):G386–96.
- [MAWE und GERSHON 1989] MAWE, G.M. und M. GERSHON (1989). *Structure, afferent innervation, and transmitter content of ganglia of the guinea*

- pig gallbladder: relationship to the enteric nervous system.* J Comp Neurol, 283(3):374–390.
- [MAWE et al. 1989b] MAWE, G.M., M. SCHEMANN, J. WOOD und M. GERSHON (1989b). *Immunocytochemical analysis of potential neurotransmitters present in the myenteric plexus and muscular layers of the corpus of the guinea pig stomach.* Anat Rec, 224(3):431–442.
- [MAYER et al. 1982] MAYER, C. J., H. CAMERER, K. DEMBOWSKY, P. GRAFE und A. STEIGER (1982). *Actions of Amino-Acid Neurotransmitters on Myenteric Neurons.* In: *Motility of the Digestive Tract*, S. 103–108. Raven Press, New York.
- [MESSENGER et al. 1994] MESSENGER, J.P., J. BORNSTEIN und J. FURNESS (1994). *Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of the guinea-pig.* Neuroscience, 60(1):227–244.
- [MEULEMANS et al. 1993] MEULEMANS, A.L., L. HELSEN und J. SCHUURKES (1993). *The role of nitric oxide (NO) in 5-HT-induced relaxations of the guinea-pig stomach.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 348(4):424–430.
- [NAKAJIMA et al. 1997] NAKAJIMA, M., Y. SHIHHARA, Y. SHIBA, I. SANO, T. SAKAI, A. MIZUMOTO und Z. ITOH (1997). *Effect of 5-hydroxytryptamine on gastrointestinal motility in conscious guinea-pigs.* Neurogastroenterol Motil, 9(4):205–214.
- [NEUNLIST und SCHEMANN 1997] NEUNLIST, M. und M. SCHEMANN (1997). *Projections and neurochemical coding of myenteric neurons innervating the mucosa of the guinea pig proximal colon.* Cell Tissue Res, 287(1):119–125.
- [NISHIMARU et al. 1996] NISHIMARU, H., M. IIZUKA, S. OZAKI und N. KUDO (1996). *Spontaneous motoneuronal activity mediated by glycine and GABA in the spinal cord of rat fetuses in vitro.* J Physiol Lond, 497(Pt 1):131–143.
- [NORTH und SURPRENANT 1985] NORTH, R.A. und A. SURPRENANT (1985). *Inhibitory synaptic potentials resulting from alpha 2-adrenoceptor activation in guinea-pig submucous plexus neurones.* J Physiol Lond, 358:17–33.
- [PENNER et al. 1993] PENNER, S.B., D. SMYTH und G. GLAVIN (1993). *Effects of neuropeptide Y and [Leu31,Pro34] neuropeptide Y on experimental gastric lesion formation and gastric secretion in the rat.* J Pharmacol Exp Ther, 266(1):339–343.

- [PFANNKUCHE et al. 1998a] PFANNKUCHE, H., D. REICHE, U. FIRZLAFF, H. SANN und M. SCHEMANN (1998a). *Enkephalin-Immunoreactive Subpopulations in the Myenteric Plexus of the Guinea-Pig Fundus Project Primarily to the Muscle and Not to the Mucosa*. Cell Tissue Res, im Druck.
- [PFANNKUCHE et al. 1998b] PFANNKUCHE, H., D. REICHE, H. SANN und M. SCHEMANN (1998b). *Different Subpopulations of Cholinergic and Nitroergic Myenteric Neurons Project to Mucosa and Circular Muscle of the Guinea-Pig Gastric Fundus*. Cell Tissue Res, 292(3):463–475.
- [PORTBURY et al. 1996] PORTBURY, A.L., J. FURNESS, B. SOUTHWELL, H. WONG, J. WALSH und N. BUNNETT (1996). *Distribution of neurokinin-2 receptors in the guinea-pig gastrointestinal tract*. Cell Tissue Res, 286(3):281–292.
- [PRECHTL und POWLEY 1990] PRECHTL, J.C. und T. POWLEY (1990). *The Fiber Composition of the Abdominal Vagus of the Rat*. Anat. Embryol. Berl., 181(2):101–115.
- [RACKE et al. 1990] RACKE, K., H. SCHWÖRER und H. KILBINGER (1990). *Effects of the Benzodiazepine Receptor Agonist Midazolam and Antagonist Flumazenil on 5-Hydroxytryptamine Release from Guinea-Pig Intestine in Vitro. Indirect Support for a 'natural' Benzodiazepine-Like Substance in the Intestine*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 341(1-2):1–7.
- [RAUFMAN 1992] RAUFMAN, J.-P. (1992). *Gastric Chief Cells: Receptors and Signal Transduction Mechanisms*. Gastroenterology, 102(2):699–710.
- [READ und GWEE 1994] READ, N.W. und K. GWEE (1994). *The importance of 5-hydroxytryptamine receptors in the gut*. Pharmacol Ther, 62(1-2):159–173.
- [ROMAN und GONELLA 1994] ROMAN, C. und J. GONELLA (1994). *Extrinsic Control of Digestive Tract Motility*. In: JOHNSON, L.R., Hrsg.: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Bd. 1. Raven Press, New York, 3 Aufl.
- [SCHAAF 1995] SCHAAF, C. (1995). *Die Identifizierung und Charakterisierung cholinergischer und nitroerger enterischer Schaltkreise im myenterischen Plexus des Meerschweinchenmagens*. Doktorarbeit, FB Biologie Justus-Liebig-Universität Giessen.
- [SCHEMANN 1991a] SCHEMANN, M. (1991a). *5-Hydroxytryptamine-Mediated Responses in Myenteric Neurons of the Guinea Pig Gastric Corpus: Effect of*

- ICS 205-930 and Cisapride*. *Journal of Gastrointestinal Motility*, 3(4):255–262.
- [SCHEMANN 1991b] SCHEMANN, M. (1991b). *Excitatory and inhibitory effects of norepinephrine on myenteric neurons of the guinea-pig gastric corpus*. *Pflugers Arch*, 418(6):575–580.
- [SCHEMANN 1992] SCHEMANN, M. (1992). *Characteristics of Myenteric Neurons in the Gastric Corpus*. In: HOLLE, G.E. und J. WOOD, Hrsg.: *Advances in the Innervation of the Gastrointestinal Tract*, S. 147–156. Elsevier Science.
- [SCHEMANN und GRUNDY 1992] SCHEMANN, M. und D. GRUNDY (1992). *Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach*. *Am J Physiol*, 263(5 Pt 1):G709–18.
- [SCHEMANN und KAYSER 1991] SCHEMANN, M. und H. KAYSER (1991). *Effects of tachykinins on myenteric neurones of the guinea-pig gastric corpus: involvement of NK-3 receptors*. *Pflugers Arch*, 419(6):566–571.
- [SCHEMANN et al. 1993] SCHEMANN, M., H. SANN, C. SCHAAF und M. MÄDER (1993). *Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase*. *Am J Physiol*, 265(5 Pt 1):G1005–9.
- [SCHEMANN und SCHAAF 1995] SCHEMANN, M. und C. SCHAAF (1995). *Differential projection of cholinergic and nitroxidergic neurons in the myenteric plexus of guinea pig stomach*. *Am J Physiol*, 269(2 Pt 1):G186–95.
- [SCHEMANN et al. 1995] SCHEMANN, M., C. SCHAAF und M. MÄDER (1995). *Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach*. *J Comp Neurol*, 353(2):161–178.
- [SCHEMANN und TAMURA 1992] SCHEMANN, M. und K. TAMURA (1992). *Pre-synaptic inhibitory effects of the peptides NPY, PYY and PP on nicotinic EPSPs in guinea-pig gastric myenteric neurones*. *J Physiol Lond*, 451:79–89.
- [SCHEMANN und WOOD 1989a] SCHEMANN, M. und J. WOOD (1989a). *Electrical behaviour of myenteric neurones in the gastric corpus of the guinea-pig*. *J Physiol Lond*, 417:501–518.
- [SCHEMANN und WOOD 1989b] SCHEMANN, M. und J. WOOD (1989b). *Synaptic behaviour of myenteric neurones in the gastric corpus of the guinea-pig*. *J Physiol Lond*, 417:519–535.

- [SICK und TEDESKO 1908] SICK, K. und F. TEDESKO (1908). *Studien über die Magenbewegung mit besonderer Berücksichtigung der Ausdehnungsfähigkeit des Hauptmagens (Fundus)*. Deutsches Archiv für klinische Medizin, 92:416–451.
- [STACH 1989] STACH, W. (1989). *A Revised Morphological Classification of Neurons in the Enteric Nervous System*. In: SINGER, M.V. und H. GOEBELL, Hrsg.: *Nerves and the Gastrointestinal Tract*, S. 29–45. Kluwe Academic Publishers, Lancaster.
- [STACHER et al. 1990] STACHER, G., H. BERGMANN, C. SCHNEIDER, G. STEINER MITTELBACH, G. GAUPMANN, H. STEINRINGER, T. ABATZI und G. STACHER JANOTTA (1990). *Effects of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ICS 205-930 on fat-delayed gastric emptying and antral motor activity*. Br J Clin Pharmacol, 30(1):41–48.
- [STERNINI et al. 1987] STERNINI, C., J. REEVE, J.R. und N. BRECHA (1987). *Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats*. Gastroenterology, 93(4):852–862.
- [TACK et al. 1992] TACK, J.F., J. JANSSENS, G. VANTRAPPEN und J. WOOD (1992). *Actions of 5-hydroxytryptamine on myenteric neurons in guinea pig gastric antrum*. Am J Physiol, 263(6 Pt 1):G838–46.
- [TACK und WOOD 1992] TACK, J.F. und J. WOOD (1992). *Actions of noradrenaline on myenteric neurons in the guinea pig gastric antrum*. J Auton Nerv Syst, 41(1-2):67–77.
- [TAMURA et al. 1993] TAMURA, K., M. SCHEMANN und J. WOOD (1993). *Actions of nitric oxide-generating sodium nitroprusside in myenteric plexus of guinea pig small intestine*. Am J Physiol, 265(5 Pt 1):G887–93.
- [TARIQ und AL MOUTAERY 1997] TARIQ, M. und A. AL MOUTAERY (1997). *Studies on the antisecretory, gastric anti-ulcer and cytoprotective properties of glycine*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 97(2):185–198.
- [TIMMERMANS et al. 1997] TIMMERMANS, J.P., D. ADRIAENSEN, W. CORNELISSEN und D. SCHEUERMANN (1997). *Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes*. Comp Biochem Physiol A Physiol, 118(2):331–340.

- [ULMAN et al. 1995] ULMAN, L.G., E. POTTER und D. MCCLOSKEY (1995). *Inhibition of vagally induced gastric contractions by sympathetic stimulation, neuropeptide Y and galanin*. J Auton Nerv Syst, 55(3):193–197.
- [UNO et al. 1997] UNO, H., T. ARAKAWA, T. FUKUDA, K. HIGUCHI und K. KOBAYASHI (1997). *Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastric adaptive relaxation in isolated guinea-pig stomachs*. Digestion, 58(3):232–239.
- [WADE et al. 1994] WADE, P.R., H. TAMIR, A. KIRCHGESSNER und M. GERSHON (1994). *Analysis of the role of 5-HT in the enteric nervous system using anti-idiotopic antibodies to 5-HT receptors*. Am J Physiol, 266(3 Pt 1):G403–16.
- [WANG et al. 1995] WANG, L., S. SAVEDIA, M. BENJAMIN und M. PERDUE (1995). *The role of mast cells in intestinal immunophysiology*. Adv Exp Med Biol, 371A:287–292.
- [WOOD 1994] WOOD, J.D. (1994). *Physiology of the Enteric Nervous System*. In: JOHNSON, L.R., Hrsg.: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Bd. 1, Kap. 10, S. 423–482. Raven Press, New York, 3 Aufl.
- [WOOD und MAYER 1978] WOOD, J.D. und C. MAYER (1978). *Slow synaptic excitation mediated by serotonin in Auerbach's plexus*. Nature, 276(5690):836–837.
- [WOOLLARD et al. 1994] WOOLLARD, D.J., J. BORNSTEIN und J. FURNESS (1994). *Characterization of 5-HT receptors mediating contraction and relaxation of the longitudinal muscle of guinea-pig distal colon in vitro*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 349(5):455–462.
- [YAMANO und MIYATA 1996] YAMANO, M. und K. MIYATA (1996). *Investigation of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated contraction in guinea-pig distal colon*. Eur J Pharmacol, 317(2-3):353–359.
- [YUAN et al. 1994] YUAN, S.Y., J. BORNSTEIN und J. FURNESS (1994). *Investigation of the role of 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in ascending and descending reflexes to the circular muscle of guinea-pig small intestine*. Br J Pharmacol, 112(4):1095–1100.
- [ZHANG und BERG 1995] ZHANG, Z.W. und D. BERG (1995). *Patch-clamp analysis of glycine-induced currents in chick ciliary ganglion neurons*. J Physiol Lond, 487(Pt 2):395–405.

# Wissenschaftlicher Werdegang

1984–1991:

Physikstudium an der Georg-August-Universität Göttingen. Abschluss mit einer Diplomarbeit zum Thema „Dielektrisches Verhalten leitfähiger, dotierter Polymerfolien“ am Institut für Schwingungsphysik.

1992–1994:

Aufbaustudium Biomedizinische Technik an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Thema der Studienarbeit: „Untersuchungen des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Verhältnisses an Tumor- und Normalgewebe“.

1995-1998:

Doktorarbeit am Institut für Physiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover mit dem Thema „Elektrophysiologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener Neurotransmitter im myenterischen Plexus des Meerschweinchenmagens“.

## Veröffentlichungen:

K. Michel, W. Giese:  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Untersuchungen an Tumorzellen, *Isotopes Environ. Health Stud.* 1995, Vol. 31, 255-260.

K. Michel, H. Sann, C. Schaaf, M. Schemann: *Subpopulations of gastric myenteric neurons are differentially activated via distinct 5-HT receptors: Projection, neurochemical coding and functional implications*, *J. Neuroscience*, 1997, Vol. 17, 8009-8017.

D. Reiche, K. Michel, M. Schemann: *Structural and functional organisation of the enteric nervous system in the stomach*, *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 1998, Vol. 105, 461-465.

D. Reiche, H. Pfannkuche, K. Michel, S. Hoppe, M. Schemann: *Immunohistochemical evidence for the presence of calbindin containing neurons in the myenteric plexus of the guinea pig stomach*, *Neuroscience Letters*, 1999, im Druck.

## Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. M. Schemann für die Überlassung des Arbeitsthemas und die motivierende Betreuung danken. Er war zu (fast) jeder Zeit zu Diskussionen und tatkräftiger Hilfe bereit.

Mein weiterer Dank gilt seiner Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut. Insbesondere Dr. H. Sann, der fast alles weiß und für alles ein Paper oder mindestens einen Abstract findet. Aber auch alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe halfen durch ihr Wissen und ihre Zusammenarbeit und machten den Laboralltag oft zum Erlebnis.

Frau Susanne Hoppe möchte ich besonders für die 'Hintergrundarbeit' im Labor danken. Ohne sie wäre vieles kaum möglich gewesen.

Claudia möchte ich für vieles und ihre Toleranz während der gesamten Doktorarbeit danken.

Die hier vorliegende Arbeit wurde von mir selbstständig verfaßt. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.  
Diese Arbeit wurde noch nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover den 30.6.1998

Klaus Michel