

Technische Universität München

TUM School of Life Sciences

Dehnungsinduzierte nerval und nicht-nerval vermittelte Sekretion im Humancolon

Stefanie Franziska Schäuffele

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Harald Luksch

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Michael Schemann

2. Prof. Dr. Martin Klingenspor

Die Dissertation wurde am 25.11.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 21.03.2022 angenommen.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	2
II.	Abkürzungsverzeichnis	5
III.	Summary	6
IV.	Zusammenfassung.....	7
1.	Einleitung.....	8
1.1.	Der Gastrointestinaltrakt	8
1.2.	Ionen und Kanäle als Hauptakteure der Sekretion	13
1.3.	Erkenntnisse bisheriger Veröffentlichungen.....	16
1.4.	Ziele der Doktorarbeit	18
2.	Material und Methoden	20
2.1.	Gewebe	20
2.1.1.	Humangewebe	20
2.1.2.	Meerschweinchengewebe	21
2.1.3.	Gewebepräparation und Versuchsvorbereitung.....	22
2.2.	Geräte und Materialien	23
2.3.	Software	25
2.4.	Lösungen	25
2.5.	Die Ussingkammer.....	27
2.5.1.	Die Kammer, Aufbau und Funktion	27
2.5.2.	Versuchsdurchführung	31
2.5.3.	Material und Ablauf der Dehnungsstimulation.....	32
2.5.4.	Herstellung der Elektroden spitzen	34
2.6.	Versuche mit alternativer Versuchslösung	35
2.7.	Einsatz von Amilorid.....	35
2.8.	Versuche mit Tetrodotoxin	36
2.9.	Versuche mit ω -Conotoxin GVIA.....	36
2.10.	Versuche mit Piroxicam	36
2.11.	Versuche mit Neostigmin	37
2.12.	Versuche mit Atropin	37
2.13.	Versuche mit Tropisetron.....	37
2.14.	Versuche mit Gadolinium	38
2.15.	Versuche mit Prostaglandin E ₂	38
2.16.	Versuche mit Netzeinbau	38
2.17.	Versuche mit Mikrofiltern	39

2.18.	Beispiel der Versuchsprotokolle bei Applikation.....	39
2.19.	Auswertung der Stimulations-Versuche und Beispielgraphen.....	39
2.20.	Auswertung des Dehnungsvolumens in μl	42
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Experimente mit Meerschweinchengewebe	44
3.1.1.	Diaphragmagewebe bei Druckapplikation	44
3.1.2.	Optische Beurteilung der Dehnung in der Halbkammer	45
3.1.3.	Reproduzierbarkeit der serosalen Stimulationen bei großen und kleinen Messflächen.....	46
3.1.4.	Vergleiche der Gewebehalter-Messflächen.....	48
3.1.5.	Abhängigkeit der Antwort von der Gewebevorspannung	49
3.1.6.	Einfluss der Geschwindigkeit der Druckapplikation	51
3.1.7.	Mucosa/Submucosa- und Ganzwand-Präparate im Vergleich	53
3.1.8.	Ist die sekretorische Antwort abhängig von der Dehnung und Kompression des Gewebes	55
3.1.9.	Dehnungsinduzierte Sekretion bei hoher K^+ -Ionen-Konzentration	57
3.1.10.	Welche Mediatoren vermitteln die dehnungsinduzierte Sekretion	58
3.2.	Experimente mit Humangewebe	61
3.2.1.	Abhängigkeit der Sekretionsantwort von Druck	61
3.2.2.	Reproduzierbarkeit bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in Humangewebe.....	62
3.2.3.	Vergleich der schnellen und langsamen Druckapplikation	64
3.2.4.	Serosale und mucosale Druckapplikation im Vergleich	65
3.2.5.	TTX-Sensitivität bei serosaler und mucosaler Stimulation.....	70
3.2.6.	Vergleiche der serosal und mucosal gepulsten Stimulation	72
3.2.7.	TTX-Sensitivität bei serosal und mucosal gepulster Stimulation	74
3.2.8.	Die Rollen von Chlorid und Bikarbonat	75
3.2.9.	Vergleiche der sekretorischen Antwort bei Dehnung und Kompression.....	77
3.2.10.	Welche Mediatoren vermitteln die dehnungsinduzierte Sekretion	79
3.2.11.	Prostaglandin vermittelte Sekretion	82
3.2.12.	Einflüsse von Diagnosen, Geschlecht und Alter auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	84
3.2.13.	Serosal und mucosal stimulierte Ileumgewebe	85
4.	Diskussion.....	87
5.	Literaturverzeichnis.....	104
6.	Abbildungsverzeichnis.....	111
7.	Tabellenverzeichnis	112
8.	Anhang	113

8.1. Tabellen	113
8.2. Danksagung	130
8.3. Publikationen.....	131

II. Abkürzungsverzeichnis

µA	Mikroampere
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HT-Rezeptoren	5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
Asc.	Colon ascendens
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Atropin
CA	Karzinom
Ca²⁺	Calciumion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFTR	Cystische Fibrose Transmembran Regulator
Cl⁻	Chloridion
CIC	Spannungsabhängiger Chloridkanal
CLCA/ CaCC	Calcium aktivierter Chloridkanal
Desc.	Colon descendens
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC-Zellen	Enterochromaffine-Zellen
ENaC	Epithelialer Na ⁺ -Kanal
ENS	Enterisches Nervensystem
EST/EFS	Elektrische Stimulation/ Elektrische Feldstimulation
Gepulst	Stimulation mit 10 kurzen Pulsen von je 5 s Dauer
GIT	Gastrointestinaltrakt
GP	„guinea pig“ englisch = Meerschweinchen
HCO₃⁻	Bikarbonation
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MP	Myenterischer Plexus
mV	Millivolt
Na⁺	Natriumion
Nav	Spannungsaktivierter Na ⁺ -Kanal
NT	Neurotransmitter
PKA	Proteinkinase A
Rampe	Stimulation mit gleichbleibendem Druck bei 60 s Dauer
Rect.	Rectum
Sig.	Colon sigmoideum
SMP	Submuköser Plexus
Subm.	Submucosa
Trans.	Colon transversum
TTX	Tetrodotoxin
TU	Tumor
VGCC	Spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanal
VGSC	Spannungsabhängiger Na ⁺ -Kanal
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VIP-R	Rezeptor des vasoaktiven intestinalen Peptid

III. Summary

Based on different animal models, a correlation between motility and secretion in the gastrointestinal tract has been established previously. Within the aim of this work, new insights into the distension- and pressure induced secretion were gained by means of the voltage-clamp-method in the Ussing chamber. For this purpose, experiments were also performed for the first time on human intestinal resections. In addition, the guinea pig was tested as a human model. It was shown that distension elicited a secretory response in human and guinea pig intestinal samples. The distension volume of the mucosa/submucosa preparations was higher in the guinea pig than in human tissue samples at the same pressure, which may be caused by the distensibility of the tissues. In addition, it was shown that in humans chloride and bicarbonate anions mediate the distension induced secretion evident by the significant reduction of distension induced secretion in chloride- and chloride/bicarbonate-free experimental buffers.

Therefore, the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) plays a major role in these processes in humans. In the guinea pig, on the other hand, only chloride anions play a role in this process. Reduction of distension by increasing compression via incorporation of filters in human and guinea pig tissues showed that the pressure-induced secretory response is mediated primarily by distension rather than compression. In addition, higher pressures of 2-60 mmHg also elicited higher secretory responses in human tissues. In four of five human large-bowel regions tested, there was a lower distension induced secretion response with stimulation from the mucosal side compared to serosal. Because the cyclooxygenase inhibitor piroxicam significantly reduced the distension induced secretion response in guinea pigs and humans, the important role of prostaglandins in distension induced secretion was revealed. Subsequent application of tetrodotoxin revealed a minor, but significant nervous component. The ω -conotoxin GVIA-sensitivity demonstrated the importance of mechanosensitive synapses in mediating distension induced secretion in the human colon. Thus, the results of this work demonstrate that distension induced secretion in humans is mediated by both prostaglandins and nerves.

IV. Zusammenfassung

Basierend auf verschiedenen Tiermodellen wurde bereits zuvor ein Zusammenhang von Motilität und Sekretion im Gastrointestinaltrakt festgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun neue Erkenntnisse über die dehnungs- und druckinduzierte Sekretion mittels Voltage-Clamp-Methode in der Ussingkammer gewonnen. Hierzu wurden auch erstmalig Versuche an Darmresektaten des Menschen durchgeführt. Zusätzlich wurde das Meerschweinchen als Modell des Menschen überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Dehnung eine Sekretionsantwort in Human- und Meerschweinchen-Darmproben auslöst. Das Dehnungsvolumen der Mucosa/Submucosa-Präparate war im Meerschweinchen bei gleichem Druck höher als in Gewebeproben des Menschen, was durch die Dehnbarkeit der Gewebe hervorgerufen sein dürfte. Zudem wurde aufgezeigt, dass im Menschen die Anionen Chlorid und Bikarbonat die dehnungsinduzierte Sekretion vermitteln, da in Chlorid- und Chlorid/Bikarbonat-freien Versuchslösungen die dehnungsinduzierte Sekretion signifikant reduziert wurde. Daher spielt der Cystische Fibrose Transmembran Regulator (CFTR) im Menschen bei diesen Vorgängen die größte Rolle. Im Meerschweinchen hingegen spielt hierbei nur Chlorid eine Rolle. Bei einer Reduktion der Dehnung durch Erhöhung der Kompression mittels Einbau von Filtern bei Geweben von Mensch und Meerschweinchen zeigte sich, dass die druckinduzierte Sekretionsantwort vor allem durch Dehnung und nicht durch Kompression vermittelt wird. Zudem riefen höhere Drücke von 2-60 mmHg ebenfalls höhere Sekretionsantworten in Humangeweben hervor. In vier von fünf getesteten Dickdarmregionen des Menschen zeigte sich eine niedrigere dehnungsinduzierte Sekretionsantwort bei Stimulation von mucosaler Seite gegenüber serosaler Stimulation. Da der Cyclooxygenasehemmer Piroxicam die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort signifikant in Meerschweinchen und Mensch reduzierte, zeigte sich die bedeutende Rolle der Prostaglandine bei der dehnungsinduzierten Sekretion. Durch anschließende Applikation von Tetrodotoxin zeigte sich eine geringe aber signifikante nervale Komponente. Die ω -Conotoxin GVIA-Sensitivität zeigte die Bedeutung mechanosensitiver Synapsen bei der Vermittlung der dehnungsinduzierten Sekretion im Humancolon. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit, dass die dehnungsinduzierte Sekretion im Mensch sowohl durch Prostaglandine wie auch nerval vermittelt ist.

1. Einleitung

1.1. Der Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) stellt eines der wichtigsten Organsysteme in Säugetieren dar. Er erfüllt verschiedenste Aufgaben im Rahmen des Verdauungsvorganges. Zentrale Aufgaben sind hierbei der Erhalt der Homöostase, des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes sowie Aufnahme von Nährstoffen mittels mucosalen Transportes über die Schleimhaut, wobei die aufgenommene Nahrung zerkleinert wird und die enthaltenen Nährstoffe sowie Flüssigkeiten resorbiert werden. Je nach spezifischer Funktion der einzelnen Regionen des GIT variieren der Aufbau und die dabei ablaufenden Prozesse.

Im Falle von Mensch und Meerschweinchen handelt es sich beim GIT um einen muskulären Schlauch, welcher im Inneren mit Mucosa (einer Epithelschicht) ausgekleidet ist (Abb. 1). Dieses Epithelgewebe ist durch zwei unterschiedliche Seiten charakterisiert. Eine Seite hat hierbei direkten Kontakt zur Außenwelt auf der mucosalen oder apikalen Seite, die andere zeigt zum Interstitium, welches als serosal oder basolateral bezeichnet wird (Abb. 2); (Saint-Criq und Gray, 2017).

Der Darmaufbau des Menschen unterscheidet sich auf Grund unterschiedlicher Hauptaufgaben von Dünndarm, welcher den Großteil der Nahrungsinhaltsstoffe aufnimmt, zu Dickdarm, welcher verbliebenes Wasser und Elektrolyte resorbiert. Die Dünndarmmucosa weist daher zur Resorption Kerckring-Falten, Zotten (Villi) und den Bürstensaum (Mikrovilli) der Epithelzellen auf, welche zusammen die Resorptionsfläche deutlich vergrößern. In der Schleimhaut in Dün- und Dickdarm sitzen auch die Lieberkühn Krypten (welche die Oberfläche vergrößern und eine sekretierende Funktion haben), sowie Blutgefäße und Lymphbahnen. Auf die Mucosa als innerste Schicht folgend, befinden sich die Muskelschicht Muscularis mucosae (für die Bewegung der Zotten und Entleerung der Krypten), die Bindegewebsschicht der Submucosa, das Nervengeflecht des submucösen Plexus, die Zirkulärmuskulatur (zur Verengung des Darmlumens), das Nervengeflecht des myenterischen Plexus, die longitudinale Muskelschicht (zur Verkürzung des Darmes) sowie die alles umschließende Haut (Serosa; Abb. 1). Der Dickdarm weist eine dünnere Mucosa ohne Zotten aber mit tieferen Krypten auf, welche eine hohe Anzahl an Muzine produzierenden Becherzellen enthalten. Alle Segmente weisen in der Mucosa zudem noch weitere Zelltypen wie Enterozyten, M-Zellen, Paneth-Zellen und enteroendokrine

Zellen wie beispielsweise die enterochromaffinen Zellen auf (Allaire et al., 2018; Gershon, 2004). Die Mehrheit der Epithelzellen sind absorptive Enterozyten, wohingegen enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Paneth-Zellen sekretorische Funktionen erfüllen (Peterson und Artis, 2014). Das Colon bildet zudem Haustren und Muskelbänder (Tänien) aus, welche eine starke Dehnung des Darmes zulassen.

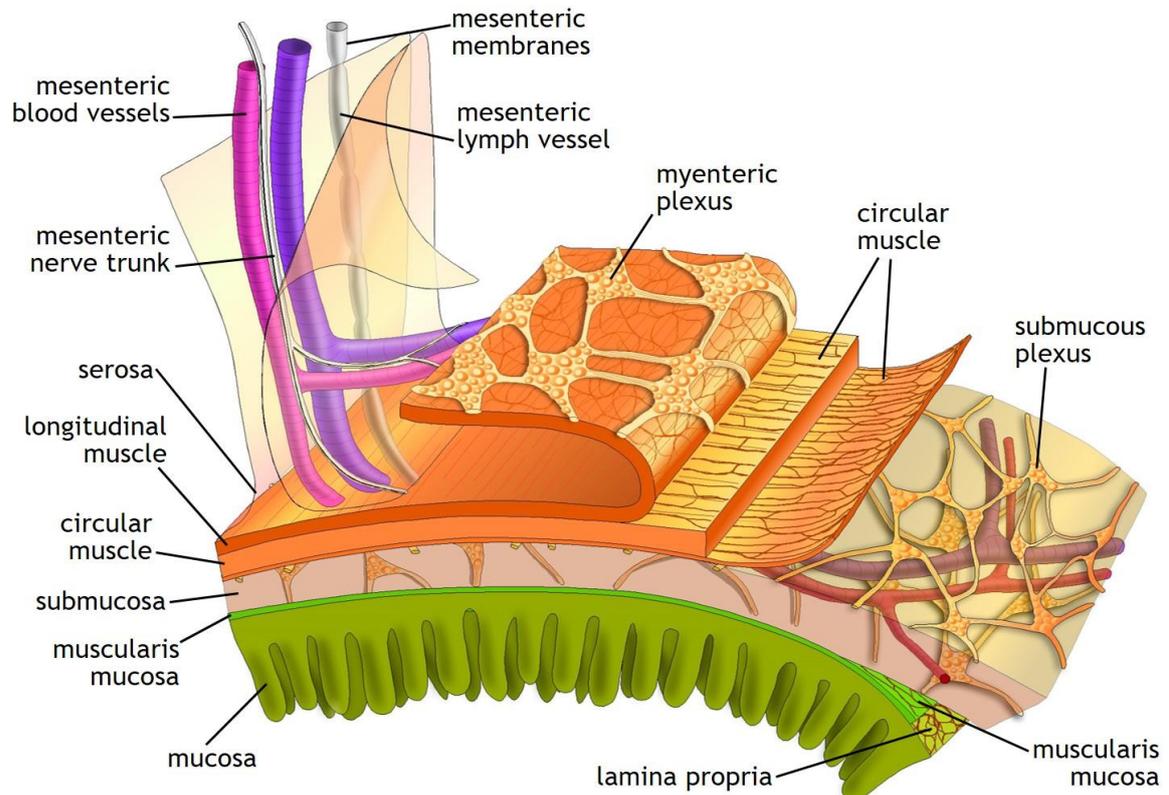


Abb. 1: Schnittbild durch die Darmwand (C) Simon Brooks.

Die Schichten des Darmes vom Darmlumen nach Außen: Mucosa (Schleimhaut) Epithelschicht, Muscularis mucosa, Submucosa, submuköser Plexus (SMP) sowie Blutgefäße, zirkulär Muskulatur, myenterischer Plexus, longitudinal Muskulatur, mesenteriale Nerven, Blutgefäße sowie Lymphgefäße.

Das Meerschweinchen stellt ein häufig verwendetes Modell für den Menschen dar. Obwohl im Vergleich zum Verdauungstrakt des Menschen Unterschiede bestehen, sind wesentliche zelluläre und molekulare Eigenschaften in Säugetieren vergleichbar (Furness et al., 2015).

Obwohl der Darm vor allem Nahrungsbestandteile und Flüssigkeiten resorbiert, ist für den Verdauungsvorgang auch eine ständige Sekretion von Wasser und Elektrolyten notwendig, um den Transport des Darminhaltes über einen Schleimfilm zu gewährleisten (Barrett, 2008; Cooke, 1998). Die Zellen der Krypten sekretieren hierzu Cl⁻-Ionen und Wasser (Sandle, 1998).

Verschiedene anatomische Parameter wirken auf die Verdauung ein. Hierbei wurden in verschiedenen Literaturquellen Länge, Fläche, Druck und Kontraktionsfrequenz im Darm des Menschen auf verschiedenste Weise untersucht.

Die Oberfläche der Mucosa des Humancolons liegt bei ca. 2000 cm². Die Menge der Absorption von Ionen und Wasser ist im Colon ascendens größer als im Colon descendens, Colon sigmoideum und Rectum (Sandle, 1998).

Bei in vivo Messungen des Dickdarmes wiesen Männer kürzere Längen und kleinere Oberflächen des Dickdarmes auf als Frauen. Colon transversum und Colon sigmoideum waren hierbei die längsten Abschnitte, das Colon ascendens und das Rectum die kürzesten (Sadahiro et al., 1992).

Die muskulären Kontraktionen im Dünndarm liegen beim Mensch bei einer Frequenz von 7-20 pro Minute, im Dickdarm dagegen mit 2-13 pro Minute niedriger (Gayer und Basson, 2009). Die motorische Aktivität des Dickdarms ist gekennzeichnet durch phasische oder kurze Kontraktionen mit nachfolgender Relaxation sowie tonische oder langanhaltende Kontraktionen (Golenhofen und Mandrek, 1991; Keller et al., 2018). Zudem wurden physiologische Drücke der fortlaufenden Kontraktionen manometrisch von 11,6±3,6 mmHg anterograd, 13,6±4,1 mmHg retrograd und bei Druckbeaufschlagung von 24,4±11,5 mmHg bestimmt (Heitmann et al., 2021). Weitere manometrische Messungen zeigten ebenfalls, dass zyklische motorische Muster des Colons bei 10-30 mmHg lagen (Huizinga und Chen, 2021; Pervez et al., 2020).

Vorherrschende Drücke im Darm wurden zudem mittels barostatischer Ballons im Dickdarm durch die Wahrnehmung unterschiedlicher Drücke untersucht. Genutzt wurde eine rampenartige, aufsteigende Erhöhung des Druckes von 0-60 mmHg in 4 mmHg Schritten mit einer Dauer von je 60 Sekunden. Die jeweiligen Wahrnehmungen ergaben sich bei folgenden Drücken: Erste Druckwahrnehmung von 6-15 mmHg, Defäkationswunsch von 14-34 mmHg, Unwohlsein bei 25-38 mmHg sowie Schmerz bei 37-44 mmHg (Bharucha et al., 1997; Bouin et al., 2002; Cremonini et al., 2005; Hammer et al., 2007; Naliboff et al., 1997).

Wenn das physiologische Gleichgewicht des Darmes gestört wird, kommt es zu einer sekretorischen Dysfunktion, welche sich als Symptome von Darmerkrankungen wie Diarrhoe oder Verstopfung manifestieren (Krueger et al., 2016; Lacy et al., 2012). Neben den physiologischen Aufgaben dient die Sekretion in das Darmlumen auch der

Abwehr von körperfremden Stoffen und Pathogenen. Analog zum Ausschwemmen von Fremdkörpern im Auge mittels Tränenproduktion, sekretiert der Darm „enterische Tränen“ (Cooke, 1998). Kommt das Darmepithel mit Antigenen in Kontakt, welche als körperfremd eingestuft werden, löst dies eine Erhöhung der Chlorid-Sekretion und somit den sekretorischen Reflex aus. Dieser wird durch direkte Mechanismen über epitheliale Zellen oder Neurone, als auch indirekt durch Freisetzen von intermediären Botenstoffen (Messengern) gesteuert. Die Neurotransmitter (NT) aktivieren Kryptenzellen des Epithels der Darmschleimhaut, welche Chlorid- und weitere Ionen sowie Flüssigkeit sekretieren. Dieser Sekretionsreflex wird vom GIT durch Aktivierung von Neuronen mittels Hormonfreisetzung, parakrinen Substanzen und Immunmediatoren moduliert (Cooke, 2006).

Im Rahmen der Verdauung bewegt der GIT den Darminhalt in peristaltischen Wellen durch das Lumen voran. Bereits 1889 wurde anhand der ersten in vivo Versuche von Lüderitz bei Dehnung des Darmes eine reflektorische Kontraktion beschrieben (Lüderitz, 1889; Schemann et al., 2021). 1899 beschrieben auch Bayliss und Starling ex vivo, dass eine mechanische Reizung der Muskulatur und Mucosa des Darmes eine lokale Muskelbewegung auslöst und somit der Darminhalt in anale Richtung transportiert wurde (Bayliss und Starling, 1899). Aus diesen Versuchen resultierte die Bezeichnung „Lüderitz-Bayliss-Starling Reflex“ für diesen Vorgang (Schemann et al., 2021).

Mittels transmuralen Potentialdifferenzmessungen im Frettchen, welche den mucosalen Ionenfluss aufzeigten, wurde zudem in vivo gezeigt, dass Motilität und Sekretion gekoppelt sind (Greenwood und Palmer, 1996).

Die Regulation der Verdauung im GIT geschieht unabhängig vom zentralen Nervensystem (ZNS) über das enterische Nervensystem (ENS), welches sich in den Wänden des GIT befindet (Hansen, 2003a; Schemann et al., 2002).

Das ENS steuert Motilität, Resorption und Sekretion sowie Immunantworten (Hansen, 2003a). Wegen seiner Größe, Komplexität und seiner Autonomie, d.h. der Unabhängigkeit vom ZNS, wird das ENS auch als „zweites Gehirn“ bezeichnet (Furness, 2006; Gershon, 1999). Diese autonome Funktionsweise kann durch den sympathischen und parasympathischen Teil des vegetativen Nervensystems beeinflusst werden (Blackshaw et al., 2007).

Im ENS werden vor allem zwei netzartige neuronale Geflechte, Plexus genannt, unterschieden. Diese bestehen aus Nervenzellen und Nervenfasern. Der myenterische oder Auerbach-Plexus (MP) befindet sich zwischen der äußeren longitudinalen und der zirkulären Muskulaturebene und reguliert vor allem muskuläre Darmprozesse wie Durchmischung und Vorantreiben des Nahrungsbreis (Auerbach, 1862; Schemann und Neunlist, 2004). Der submucöse Plexus (SMP) liegt in der submucosalen Schicht direkt unterhalb der Mucosa und somit nahe am Darmlumen. Der SMP regelt vor allem die Abläufe von Sekretion und Absorption (Hansen, 2003a; Meissner, 1857; Schemann und Neunlist, 2004).

Beim Menschen besteht der SMP aus drei Schichten, dem inneren SMP unterhalb der Muscularis mucosae, dem intermediären SMP sowie dem äußeren SMP direkt unterhalb der Zirkulärmuskulatur (Hoyle und Burnstock, 1989). Auch im Falle kleinerer Säugetiere wie dem Meerschweinchen besteht der SMP aus mehreren Schichten.

Das enterische Nervensystem nutzt zur interneuronalen Kommunikation verschiedene NT, wobei der Mechanismus ähnlich komplex wie im ZNS zu sein scheint (Hansen, 2003a). Transmitter, welche die sekretorische Aktivität des Epithels erhöhen sind Acetylcholin (ACh) und vasoaktives intestinales Peptid (VIP); (Xue et al., 2007).

Funktional klassifiziert lassen sich die Neurone im ENS in die drei Gruppen der sensorischen Neurone, Interneurone und Motoneurone einteilen. In Bezug auf die Sekretionsvorgänge sind sowohl die sensorischen Neurone und Sekretomotoneurone aus der Gruppe der Motoneurone wie auch die cholinergen Interneurone von Bedeutung (Hansen, 2003a; Michel et al., 2021).

Sensorische Neurone reagieren auf mechanische, thermische wie auch chemische Stimuli und geben diese Information zur Auslösung eines Reflexes weiter (Hansen, 2003a; Mazzuoli-Weber und Schemann, 2015). Als mechanische Stimuli können Dehnung und Kompression von unterschiedlich charakterisierten Neuronen erfasst werden (Kreutz, 2018).

Im Darm beeinflussen sensorische Neurone die Motilität, Sekretion und Blutfluss (Grundy und Schemann, 2006). Zudem können Neurone durch Serotonin (5-HT) aktiviert werden. Der 5-HT₃-Rezeptor, bei welchem es sich um den einzigen Ligandengesteuerten Kationen-Kanal der 5-HT-Rezeptoren handelt, wird auf Neuronen exprimiert (Barnes et al., 2009; Hansen, 2003b). Es wurde zudem gezeigt, dass durch

Stimulation der sensorisch aktiven enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen) im enterischen Epithel die bedeutendste 5-HT Menge des Körpers freigesetzt wird. Durch mechanische Reize werden die in der Mucosa gelegenen EC-Zellen zur Synthese des Mediators 5-HT angeregt (Cooke, 2006; Gershon, 2004). Die EC-Zellen gelten daher als sensorische Zellen. Ebenfalls lösen mechanische Stimuli eine Sekretion von Prostaglandinen bei weiteren sensorischen Zellen aus (Cooke, 2006). Je nach Darmregion reagieren bis zu 60% des gesamten ENS auf mechanische Stimuli (Mazzuoli-Weber und Schemann, 2015).

1.2. Ionen und Kanäle als Hauptakteure der Sekretion

Entscheidend für Absorption und Sekretion ist der osmotische Gradient, welcher dafür sorgt, dass Wasser passiv in die Zelle aufgenommen oder abgegeben wird.

Im Darm wird die Flüssigkeit vor allem durch Anionensekretion von Cl^- -Ionen ins Lumen bewegt (Xue et al., 2007). Die Absorption von Na^+ -Ionen erzeugt dabei die elektrochemische Antriebskraft für den passiven Chloridtransport von luminal nach basolateral (Saint-Criq und Gray, 2017).

Um die Ionen und weitere Bestandteile über die Epithelbarriere zu transportieren, ist die Expression von Ionenkanälen und -transportern notwendig. Ionenkanäle sind Kanalproteine in Plasmamembranen, welche den Durchtritt von Ionen selektiv entlang des elektrochemischen Gradienten durch Öffnen und Schließen geregelt ermöglichen.

Sogar im Ruhezustand des Darmes ohne Stimulationen von außen findet eine basale Sekretion statt, welche dem Nettostrom an Ionen- und Flüssigkeitsdurchfluss ins Lumen entspricht. Die Modulation der Sekretionsmenge erfolgt auch über die Freisetzung endogener neuraler oder parakriner Mediatoren (Cooke, 2006).

Die Aufgaben der Chloridkanäle sind u.a. Regulation des Zellvolumens und ionischer Homöostase, transepithelialer Transport sowie Regulation der elektrischen Erregbarkeit. Dies geschieht im Zusammenspiel mit weiteren Ionentransportern wie Pumpen, Cotransportern und Ionenkanälen (Jentsch et al., 2002).

Bei der Sekretion selbst sind die Cl^- -Ionen wichtige Hauptakteure. Im Folgenden werden drei bedeutende Klassen von Chloridkanälen im Säugetier entsprechend ihres Mechanismus näher beschrieben. Neben Cl^- können auch weitere Anionen wie I^- , Br^- ,

NO_3^- und HCO_3^- die Kanäle passieren (Jentsch et al., 2002; Nilius und Droogmans, 2003).

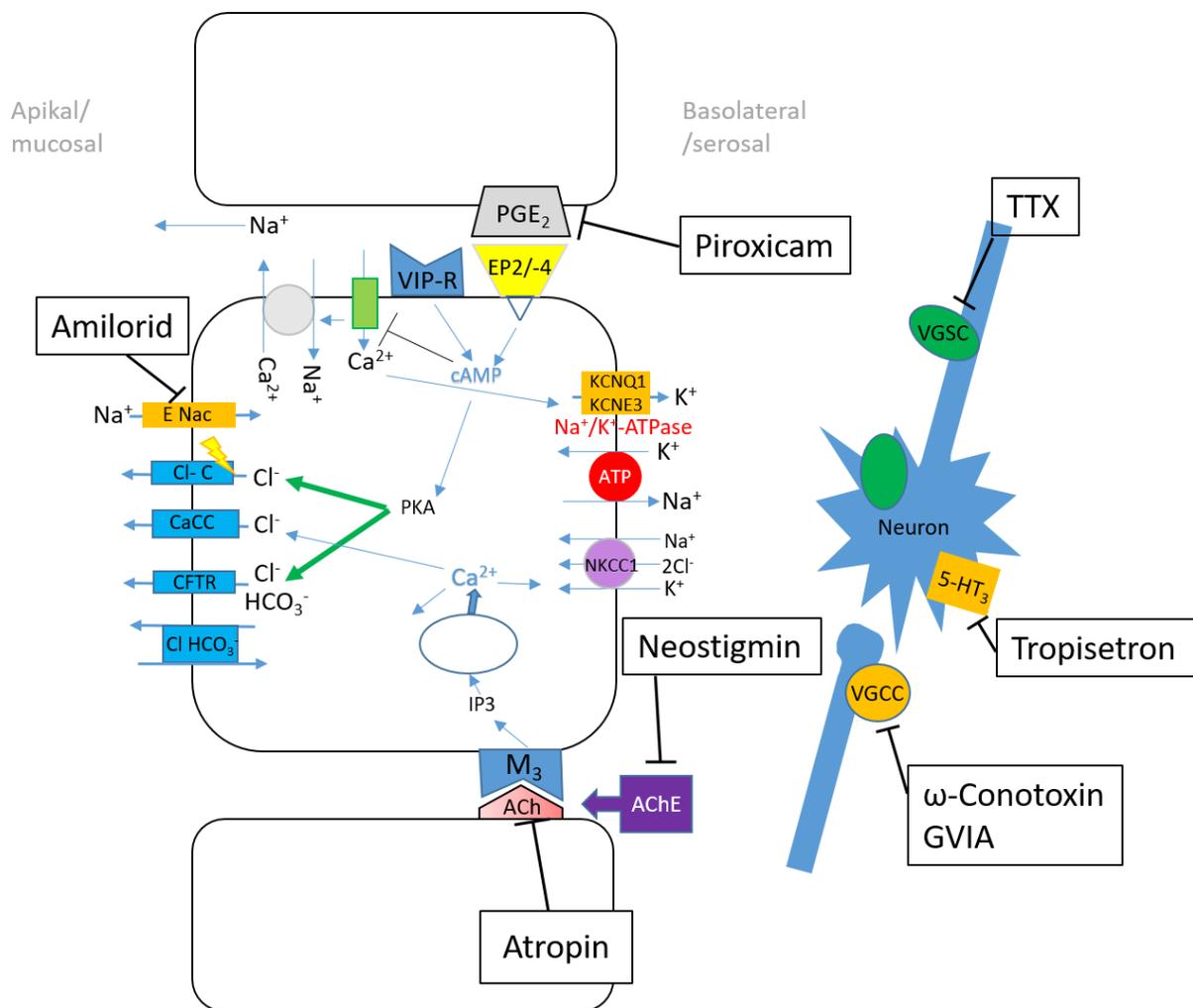


Abb. 2: Schematische Darstellung von Epithelzellen mit wichtigen Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren beim Sekretionsvorgang im Darm. Anionenkanäle sind in Blau gezeigt, Kationenkanäle in Orange. Durch die Na^+/K^+ -ATPase und den $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2 \text{Cl}^-$ Cotransporter (NKCC1) wird ein elektrochemischer Gradient aufgebaut, welchem entlang Ionen durch verschiedene Ionenkanäle folgen. Auf der apikalen Epithelseite wird daher Chlorid durch spannungsabhängige Chloridkanäle (ClC), calciumaktivierte Chloridkanäle (CaCC) und den cystischen Fibrose Transmembran Regulator (CFTR) sekretiert. Zudem werden elektroneutral Ionen per $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Tauscher über die Membran befördert. Die Aktivierung des muskarinischen M₃-Rezeptors durch Acetylcholin (ACh) führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} , was die Cl^- Sekretion verstärkt. Auch binden des Prostaglandin EP2/-4-Rezeptors und/oder des VIP (vasointestinales Peptid)-Rezeptors (VIP-R) verstärkt sich via cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) und Proteinkinase A (PKA) die Cl^- Sekretion. Na^+ wird entlang des Gradienten durch ENaC aufgenommen. Die pharmakologischen Stoffe (in schwarzen Kästen gezeigt) können am jeweilig gezeigten Mechanismus hemmend einsetzen. Die spannungsabhängigen N-Typ Ca^{2+} Kanäle (VGCC) und spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle (VGSC) auf Neuronen können durch Spannungsänderungen geöffnet werden, womit es zu einer Depolarisierung des Neurons kommt. ACh wird von der Acetylcholinesterase (AChE) deaktiviert (Verändert von Greger, 2000; Krüger, 2010).

Der Cystische Fibrose Transmembran Regulator (CFTR) wird unter anderem apikal im GIT exprimiert und macht den bedeutendsten Teil der Cl^- -Sekretion aus (Abb. 2);

(Anderson et al., 1992; Lipecka et al., 2002; Verkman und Galletta, 2009). Wie bereits erwähnt kann auch Bikarbonat durch den CFTR hindurchtreten (Bachmann und Seidler, 2011; Barrett und Keely, 2000). Im Dünn- und Dickdarm des Menschen hat HCO_3^- einen starken Einfluss auf die ENS vermittelte Sekretion (Krueger et al., 2016). Die Chlorid-Aufnahme auf der basolateralen Seite stellt die antreibende Kraft für die luminalen Chlorid-Sekretion über CFTR und calciumabhängige Chlorid-Kanäle dar (Krueger et al., 2009).

Der CFTR ist Teil der Familie der ATP-bindenden Kassetten (ABC) Transporter Proteinen. Von dieser Familie ist der CFTR der einzige bekannte Ionenkanal (Gadsby und Nairn, 1999). CFTR wird durch die cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Jentsch et al., 2002; Verkman und Galletta, 2009).

Ein weiterer Akteur beim Anionentransport ist der basolateral gelegene $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1); (Abb. 2). Er transportiert unter Verbrauch der Energie der Na^+/K^+ -ATPase die Cl^- -Ionen entgegen dem elektrochemischen Gradienten vom Blutstrom ins Darmlumen, wobei Wasser passiv nachfolgt (Barrett, 2008).

Zum Recycling der K^+ -Ionen, deren Konzentration u.a. beim Cotransport in der Zelle ansteigt, werden über basolaterale Kaliumkanäle (KCNQ1/KCNE3) die K^+ -Ionen wieder aus der Zelle befördert. Die Kanäle werden wie auch der CFTR durch cAMP stimuliert (Jentsch et al., 2002).

Man nimmt an, dass es sich bei der CLCA/ CaCC Familie um Calcium (Ca^{2+}) aktivierte Chloridkanäle handelt (Abb. 2); (Jentsch et al., 2002; Nilius und Droogmans, 2003). Die Funktionen des CaCC sind u.a. epitheliale Sekretion von Elektrolyten und Wasser. Ca^{2+} aktiviert den Kanal erstens durch direktes Binden des Kanals oder zweitens indirekt durch Ca^{2+} -bindende Proteine oder Ca^{2+} -abhängige Enzyme (Hartzell et al., 2005). Auch spannungsabhängige Chloridkanäle (ClC) wurden bereits beschrieben (Jentsch et al., 2002).

Die epithelialen Natriumkanäle (ENaC) sind Ionenkanäle, welche durch Amilorid geblockt werden können und vor allem der Na^+ -Absorption dienen (Abb. 2); (Garty, 1994; Jentsch et al., 2002). Die Na^+ -Absorption und Cl^- -Sekretion sind bedeutende Ionenflüsse in den Epithelzellen des Darmes. Durch Ladungsverschiebungen bedingt

durch diese Ionenflüsse kommt es bei einer Voltage-Clamp-Messung in der Ussingkammer in beiden Fällen zu einer Erhöhung des Kurzschlussstromes.

Die durch Ca^{2+} induzierte Chloridsekretion im Darm wird durch den NT ACh stimuliert, welcher den metabotropen muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor M3 der Epithelzellen bindet (Abb. 2); (Barrett, 2008). Dies erhöht die intrazelluläre Botenstoffkonzentration von Inositoltriphosphat (IP3) sowie die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 2); (Barrett und Keely, 2006; Mall et al., 1998).

Die Spaltung des ACh im synaptischen Spalt geschieht mit Hilfe des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE). Wird dieses Enzym gehemmt, kommt es durch herabgesetzte Degradation zu einem Anstieg der ACh-Konzentration am synaptischen Spalt (Fisher, 1999).

Die Beeinflussung der Sekretion unterliegt Einflüssen von zusätzlichen Mediatoren. Hierbei sind vor allem die sekretionsfördernden Prostaglandine und VIP von Bedeutung (Banks et al., 2005). Prostaglandin E_2 (PGE_2) spielt von den Prostaglandinen bei physiologischen Funktionen des GIT die vermutlich wichtigste Rolle (Dey et al., 2006).

Im Duodenum von Ratte und Mensch wurde ein stimulatorischer Effekt von PGE_2 auf die Bikarbonatsekretion gezeigt. Außerdem zeigte PGE_2 einen Einfluss auf die GIT-Motilität im Darm von Meerschweinchen und Mäusen. Das Binden von PGE_2 oder Agonisten an den Prostaglandin G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren EP2 und EP4 führt zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration, welche sich wiederum als sekretionsfördernd auswirkt, da vermehrt PKA aktiviert werden kann, welches den CFTR öffnet (Abb. 2); (Anderson et al., 1992; Dey et al., 2006).

1.3. Erkenntnisse bisheriger Veröffentlichungen

Im Colon descendens der Ratte wurden bereits 1990 Versuche zur Klärung der dehnungsinduzierten Sekretion durchgeführt. Es konnte eine dehnungsinduzierte Sekretionsantwort gemessen werden, welche mucosal um ein Drittel schwächer war als serosal. Eine Blockade der neuronalen Reizweiterleitung durch Tetrodotoxin (TTX) reduzierte die Sekretion bei Präparaten mit SMP und blockte die langsame, zweite Phase der biphasischen Sekretionsantwort, was auf eine Beteiligung von Neuronen schließen lässt. Mit einer Chlorid-freien Versuchslösung zeigte sich eine reversible Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort jedoch nicht bei Verwendung

einer Bikarbonat-freien Lösung. Zudem wurde eine Beteiligung von Prostaglandinen aufgezeigt, wobei Prostaglandine auch einen direkten Einfluss auf das Epithel hatten und auch ohne vorhandenen SMP wirkten. Im Rattendarm zeigte sich insgesamt eine druckvermittelte, dehnungsinduzierte Sekretion bei Mucosa/Submucosa-Präparaten des Colons unter Beteiligung von Prostaglandinen und submucosalen cholinergen Neuronen (Diener und Rummel, 1990). Zudem wurde im Dickdarm der Ratte gezeigt, dass eine mechanische Dehnung eine neuronal vermittelte elektrogene Cl⁻-Sekretion hervorruft (Schulzke et al., 1989).

Im Meerschweinchendarm zeigte sich ebenfalls eine dehnungsinduzierte Sekretionsantwort. Chlorid vermittelte die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort da chloridfreie Lösung die Antworten reduzierte. Beim Meerschweinchen war 5-HT nur bei der Sekretionsantwort beim Stoß auf die Mucosa involviert, bei der dehnungsinduzierten Sekretion spielte der 5-HT₃-Rezeptor jedoch keine Rolle (Frieling et al., 1992; Weber et al., 2001).

Eine Prostaglandinsynthese-Hemmung mit Piroxicam zeigte keinen Effekt auf die Antwort bei Meerschweinchengewebe. Da Prostaglandin D₂ einen verstärkenden Effekt auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort aufwies, beeinflussen wahrscheinlich exogene Prostaglandine den Ionentransport. Ein Blockieren der Natrium-Absorption über amilorid-sensitive Kanäle durch Amilorid hatte keinen Effekt auf die Sekretionsantwort. Da TTX und Atropin die Antwort reduzierten, zeigte die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort eine muskarinische neuronale Beteiligung (Frieling et al., 1992).

Dehnungsaktivierte Ionenkanäle sind im Meerschweinchen anscheinend an der dehnungsinduzierten Sekretion beteiligt, da nach Desensibilisierung von extrinsisch primär afferenten Neuronen die Sekretionsantwort durch Gadolinium reduziert wurde (Weber et al., 2001).

1.4. Ziele der Doktorarbeit

Basierend auf diesen Erkenntnissen war die Untersuchung der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in den unterschiedlichen Arealen des Humancolons das Ziel dieser Arbeit. Dabei sollten bei diesen Vorgängen auch etwaige speziesspezifische Unterschiede von Meerschweinchen und Ratte zum Menschen offengelegt werden.

Hierzu sollte untersucht werden, ob sich bei Dehnungsinduktion über Druckapplikation auch an Human-Submucosa/Mucosa-Präparaten in der Ussingkammer eine Sekretionsantwort zeigt. Zudem sollte ermittelt werden, ob es sich um eine neural oder nicht neural vermittelte Sekretion der Mucosa handelt, da in Ratte und Meerschweinchen sowohl direkte als auch indirekte Vermittlung der Sekretion aufgezeigt wurden. In den Versuchen dieser Arbeit sollten sowohl die Bedeutung der synaptischen Übertragung als auch die weitere neuronale Reizweiterleitung untersucht werden.

Um zu klären, ob eine lange Dehnung oder ein kurzer Dehnungsstimulus eine Sekretionsantwort hervorrufen kann, wurden verschieden lange Stimuli angewendet. In vorangegangenen Arbeiten wurde diese Frage bisher nicht beleuchtet.

Es wurde zudem untersucht, ob es sekretionsrelevante Unterschiede zwischen Kontraktions- oder Relaxationsbewegungen gibt, was mittels Druckapplikation auf serosaler oder mucosaler Seite des Gewebes simuliert wurde. In der Ratte hatten sich hier bereits niedrigere Antworten bei mucosaler Stimulation gezeigt. In vorangegangenen Publikationen wurde bisher vor allem die Dehnung betrachtet. Um zu ermitteln, ob eine Reduktion der Ausdehnung der Gewebe bzw. eine erhöhte Kompression der Gewebe Unterschiede in der Sekretionsantwort zeigt, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Netze und Filter untersucht. Zudem wurde mit unterschiedlich hohen Drücken auf die Präparate eingewirkt, da sich bereits im Meerschweinchen eine Korrelation von Dehnungsvolumen und Antwort gezeigt hatte.

Zusätzlich sollte die Rolle der wichtigsten sekretionsrelevanten Ionen wie Chlorid und Bikarbonat in Bezug auf die Dehnungsinduktion überprüft werden. Es wurde bereits in Ratte und Meerschweinchen eine Chlorid-Vermittlung gezeigt, jedoch nicht von Bikarbonat. Außerdem sollte die Beteiligung verschiedener Ionenkanäle und Rezeptoren auf ihren Einfluss bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort getestet werden.

Da in Meerschweinchen und Ratte Prostaglandine einen prosekretorischen Effekt auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort aufwiesen, wurde deren Rolle im Menschen auch hinsichtlich einer neuralen Beteiligung untersucht. Zudem sollte geklärt werden, ob 5-HT auch im Menschen, wie bei Meerschweinchen, bei der Sekretionsantwort unbeteiligt war. Die Beteiligung von Acetylcholin sollte zudem unter Berücksichtigung der hohen Acetylcholinesterase-Aktivität beim Menschen untersucht werden. Auch etwaige an der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort beteiligte mechanosensitive Kanäle auf Neuronen des SMP wurden mittels Gadolinium in Meerschweinchen und Mensch untersucht. Parallel zu diesen Fragestellungen wurden zusätzlich Meerschweinchen-Präparate als Modell des Menschen sowie zur Klärung methodischer Fragen herangezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Gewebe

2.1.1. Humangewebe

Humangewebe erhielt der Lehrstuhl für Humanbiologie vom Klinikum Freising, dem Klinikum Erding und dem Klinikum rechts der Isar in München. Hierbei handelte es sich um makroskopisch unauffällige und nicht geschädigte Operations-Resektate, welche unmittelbar nach Entnahme in eiskalte HEPES-Krebslösung überführt und anschließend gekühlt ins Institut transportiert wurden (Tabelle 4). Im Labor wurden die Proben dreimal mit eiskalter Präparationskrebslösung gewaschen und anschließend in dieser präpariert (Tabelle 5). Für jede Humangewebe-Probe wurde vom jeweiligen Patienten nach vorheriger Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Verwendung der in Tabelle 1 gezeigten Proben wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (5242/11).

Region	D	J	I	Z	A	T	D	S	R
Gesamtanzahl Patienten	2	1	11	1	22	17	14	52	3
Karzinom	2	1	8	1	16	13	10	23	2
Divertikulitis					1		2	23	
Colitis/Crohn			1		1			3	1
Polyp/Tumor						4		1	
Sonstige			2		4		2	2	

Tabelle 1: Diagnosen der Patienten der verwendeten Humanproben. Duodenum=D, Jejunum=J, Ileum=I, Zökum=Z, Colon ascendens=A, Colon transversum=T, Colon descendens=D, Colon sigmoideum=S, Rectum=R

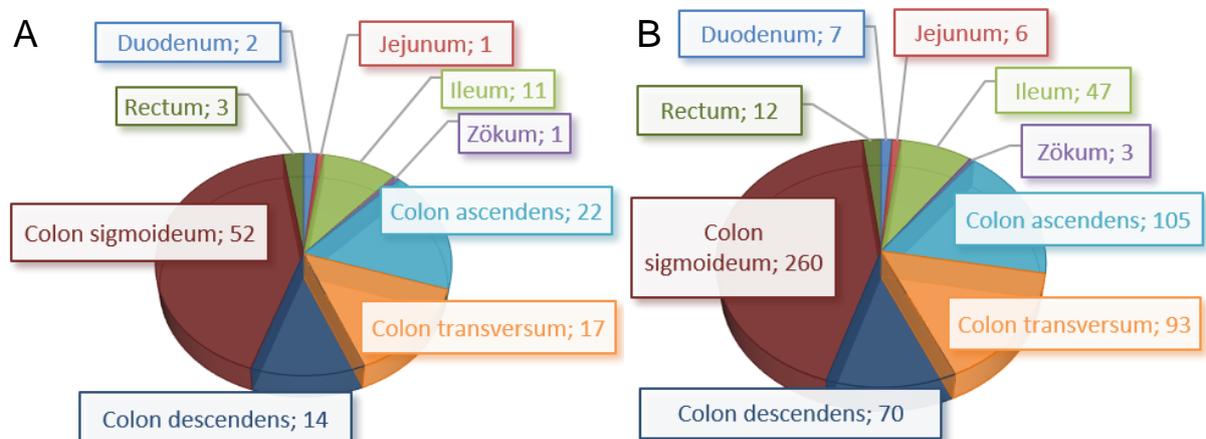


Abb. 3: Verteilung der Gewebe und Patienten. A: Anzahl der verwendeten Patientenproben gezeigt je Region. B: Anzahl der aus den Patientenproben gewonnenen Gewebe je Region.

Proben des Dün- und Dickdarms wurden 123 Patienten entnommen (72 weibliche und 51 männliche Patienten, Abb. 4) welche ein Durchschnittsalter von 66 (55/77) Jahren aufwiesen (Median, 25./75. Perzentile). Gezeigt ist die Verteilung der verwendeten Patientenproben je Region, wobei die meisten Proben aus dem Colon sigmoideum stammten (Abb. 3 A). Die Verteilung der aus den Patientenproben gewonnenen Gewebe je Region ist als Diagramm gezeigt, wobei wiederum das Colon sigmoideum den größten Anteil hatte (Abb. 3 B). Insgesamt konnten aus den Proben 603 Gewebe gewonnen und untersucht werden.



Abb. 4: Geschlechterverteilung der Patienten nach Region. F=Weiblich, M= Männlich

2.1.2. Meerschweinchengewebe

Für die Versuche wurden männliche Dunkin-Hartley Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) verwendet (Stamm 051, Charles River International GmbH, München, Deutschland). Die Tiere wurden in Klimaschränken (UniProtect, Ehret, Emmendingen, Deutschland) bei standardisierten Bedingungen (25°C Raumtemperatur, 50% Feuchtigkeit und einem Tag-Nacht Zyklus von 12:12 Stunden) gehalten. Hierbei wurden die Tiere paarweise in speziellen Typ IV Plastik Käfigen mit Streu, Behausung sowie ad libitum Futterzugang (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Wasserzugang untergebracht. Zum Zeitpunkt der Tötung wogen die Tiere 331,0 (291,8/380,0) g. Insgesamt wurden 80 Tiere verwendet, von welchen 356 Gewebe in Experimenten untersucht wurden. Getötet wurde das jeweilige Versuchstier im Präparationslabor durch Betäubung und anschließender cervikaler Dislokation. Im Anschluss wurde zum Ausbluten die Kehle eröffnet. Die gewünschten Teile des Gastrointestinaltraktes wurden durch einen Bauchschnitt entnommen. Für die

Versuche wurde ausschließlich distales Colon verwendet. Die jeweiligen Versuchsproben wurden in getrennten Segmenten in Präparationskrebslösung und vor Ausgasung geschützt bei 4°C gelagert. Die Gewebe wurden am entsprechenden Tag für Versuche verwendet. Die Haltung der Tiere entsprach den ethischen Richtlinien für Tierversuche in Deutschland (nach §§ 4, 11 Deutsches Tierschutzgesetz) und wurde durch die Regierung von Oberbayern, die als Ethikkomitee der Technischen Universität München fungiert, unter der Referenznummer 32-568-2 genehmigt.

2.1.3. Gewebepräparation und Versuchsvorbereitung

Die unter 2.1.1. und 2.1.2. vorbereiteten Gewebe wurden in Petrischalen aus Glas (217544803 Duran 100x20mm, DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland) mit Silikonelastomer Sylgard® Boden (184, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) eröffnet (Abb. 5).

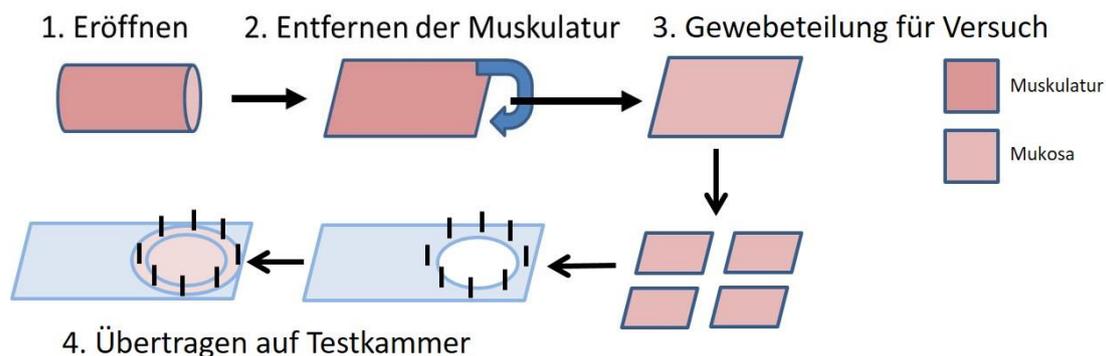


Abb. 5: Schema der Präparation der Gewebeproben (Meerschweinchen und Mensch). Das Darmstück wird entlang der Mesenteriallinie eröffnet und aufgespannt (1). Die Muskulatur wird von SMP und Mucosa getrennt. Bei Humangewebe verbleiben etwa 10 µm der zirkulären Muskulatur auf dem SMP (2); im Fall des Meerschweinchens wird hier die gesamte Muskulatur abgetragen. Das Gewebe wird entsprechend der Größe der Messfläche präpariert (3). Die einzelnen Präparate werden auf die Gewebekammer mittels Pinzette über der Messfläche auf Nadeln fixiert (4).

Die Präparation erfolgte für Human- wie auch Meerschweinchengewebe in 4°C kalter Präparationskrebslösung bei permanenter Carbogen Begasung (95% O₂, 5% CO₂; Westfalen AG, Münster, Deutschland) und Umwälzung der Präparationskrebslösung mittels Gilson Minipump 3 (Gilson, Inc., Middleton, USA). Das Gewebe wurde unter dem Stereomikroskop (SZ51 Olympus, Hamburg, Deutschland) mit Minucien Stiften (Minucie No. 15, Ento Sphinx, Pardubice, Tschechien) festgesteckt und entlang der Mesenteriallinie mit der chirurgischen Feinschere (T 14028-10, Fine Science Tools (FST), Heidelberg, Deutschland) und Gewebepinzetten INOX 4 und 5 (FST Dumont, Montignez, Schweiz) eröffnet.

Im Falle des Humangewebes wurde mit einer chirurgischen Noyes Schere (No. 15013-12, FST, Heidelberg, Deutschland) die Zirkulärmuskulatur bis auf eine etwa 10 µm dicke Schicht vom submukösem Plexus und Mucosa getrennt. Im Falle des Meerschweinchens wurde die Muskulatur mit der Moriaschere (15370-52, FST, Heidelberg, Deutschland) vom SMP-Mucosa Präparatteil abgeschnitten und vollständig entfernt. Das Gewebepräparat wurde anhand eines untergelegten Millimeterpapiers (200067501, Canson® & Montgolfier Deutschland GmbH, Gronau, Deutschland) auf 1 cm² oder 0,5 x 1 cm große Stücke unterteilt und auf die Gewebehalter (Selbstbau, vgl. 2.5.1) für die Versuche in der Ussingkammer mit den Gewebepinzetten INOX 4 und 5 übertragen. Hierzu wurde das Gewebe über der Messfläche des Gewebehalters auf den dort angebrachten Nadeln aufgespannt. Zudem wurden die Silikonelastomerpasten Baysilone (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) oder Korasilon (Kurt Obermeier GmbH & Co KG, Bad-Berleburg, Deutschland) an den Geweberändern aufgebracht, um zu starke Quetschungen des Gewebes bei verschlossenem Gewebehalter zu vermeiden. Abschließend wurde der Gewebehalter mit dem Gegenstück verschlossen.

2.2. Geräte und Materialien

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien für Präparation und Experimente

Name und Modellnummer	Hersteller
0,8 mm Goldkontakt ST+BU/Typ L Nr. 17050	Nessel Elektronik, Aspach, Deutschland
2 ml single use syringe (Spritze)	Henry Schein Inc., Melville, NY, USA
3-Wege Hahn Discofix®	Braun, Melsungen Deutschland
Air pump 200 Aquariumpumpe	EHEIM GmbH & Co. KG, Deizisau, Deutschland
Carbogen Gas	Westfalen AG, Münster, Deutschland
Chirurgische Feinschere T 14028-10	Fine Science Tools (FST), Heidelberg, Deutschland
Chirurgische Schere Noyes (No. 15013-12)	Fine Science Tools (FST), Heidelberg, Deutschland
Conical SuperClear Tubes with Flat Caps, 15 ml	PerkinElmer, Massachusetts, USA
EM-CSYS-4 Easy Mount Halterungen	Physiologic Instruments, San Diego. CA, USA
EM-CSYS-2	
Gewinkelte Pinzette (HTC 091-101)	Titan, Solingen, Deutschland
Gilson Minipump 3	Gilson, Inc., Middleton, USA
Glas Petrischalen 217544803 Duran®	DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
Grass SD-9 Stimulator	Grass-Telefactor, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA
Injekt® Solo 10 ml Luer Spritze	Braun AG, Melsungen, Deutschland
Injekt® Solo 5 ml Luer Spritze	Braun AG, Melsungen, Deutschland
Injekt®-H 1 ml, Skalenwert: 0,02 ml, 9166203V	Braun AG, Melsungen, Deutschland
Insect pins white Gr. 1, Länge 39 mm, Durchmesser 0.40 mm	Ento Sphinx, Pardubice Tschechien
Insekten Nadeln Minucie No. 15	Ento Sphinx, Pardubice, Tschechien

Messelektroden (P2020 Easy Mount Electrode Set	Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA
Messspitzen Ussing, Elektrode Tips P2023-20	Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA
MF-Millipore™ 0.45 µm MCE Membrane 25 mm	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Microschere Moria 15370-52	Fine Science Tools (FST), Heidelberg, Deutschland
Millimeterpapier (200067501)	Canson® & Montgolfier Deutschland GmbH, Gronau, Deutschland
Miniature Barbed Polypropylene Fittings Model 6365-90 (Schlauchadapter)	Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, USA
Nyral PA-9-150 Netz	Sefar Ag, Heiden, Schweiz
O-Ringe NBR 70 - Schnur 1 mm, Nr. 4219440	REIFF Technische Produkte GmbH, Reutlingen, Deutschland
Osmometer Osmomat 030 Calibration Standard 300 mosmol/kg	Gonotec™ Gesellschaft für Meß- und Regeltechnik mbH, Berlin, Deutschland
Perfusionsschläuche Tygon flexible plastic tubing 1,6 mm E-3603	Saint-Gobain Performance Plastics, site de Charny, Frankreich
Perfusionsschläuche Tygon flexible plastic tubing 3,2 mm	Saint-Gobain Performance Plastics, site de Charny, Frankreich
pH Meter inoLab pH 720 mit Messkette SenTix 41	WTW Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim i. O. Deutschland
ph Meter inoLab pH Level 1 mit Messkette Mettler Toledo InLab Micro 7323941	WTW Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim i. O. Deutschland
Pinzette INOX 4 und 5	FST Dumont, Montignez, Schweiz
Platin/Iridium Draht 90/10 0,5 mm 901134,	chemPUR Feinchemikalien und Forschungsbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PLEXIGLAS® XT Farblos 0A000 AMR	Röhm GmbH, Darmstadt, Deutschland
PowerLab® 4/36	AD Instruments, Spechbach, Germany
RCTbasic; Heizbarer Magnetrührer	IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Safe Lock Tubes 0,5 ml Eppendorf tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Silikonelastomer Baysilone® -Paste hochviskös	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Silikonelastomer Korasilon® -Paste hochviskös	Kurt Obermeier GmbH & Co KG, Bad-Berleburg, Deutschland
Silikonelastomer Sylgard®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Single Use Pressure Sensor, PRESS-S-000)	PendoTECH, Princeton, NJ, USA
Stereomikroskop Olympus SZ51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Sterican® Kanüle 0.90 x 40 mm Gr. 1 Luer-Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
TFC Silikon Kautschuk Typ 1 Abformsilikon weich	Troll Factory Rainer Habekost e.K., Riede, Deutschland
Thermomix 1441 Wasserbad	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Ultimaker 3, 3D Drucker	Ultimaker, Utrecht, Niederlande
Ussing Easy Mount Chambers P2300	Physiologic Instruments, San Diego. CA, USA
VCC MC6 and MC2 Multichannel Voltage Current Clamp/Pulse Generator	Physiologic Instruments, San Diego. CA, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries™, Bohemia, USA
Wisd Wärmebad WiseCircu Fuzzy Control System	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Scanspeed mini GS22510060479	Labogene, Lillerød, Dänemark
Zentrifugenröhrchen, PP, 15 ml, natur, konischer Boden, graduiert, steril	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.3. Software

Unter Windows 7 und 10 wurden folgende Programme verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Software und Hersteller

Name des Programms	Hersteller
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Powerpoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Labchart 8 v.8.1.10.	ADInstruments, Dunedin, Neuseeland
SigmaPlot 12.5	Systat Software GmbH, San Jose, USA
Igor Pro v.8.0.0.10 (64-bit)	WaveMetrics Inc., Portland, USA
Arduino IDE 1.8.15	Open Source

2.4. Lösungen

Sofern nicht explizit anders angegeben stammen alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.

Tabelle 4: Zusammensetzung der HEPES-Lösung

HEPES Lösung		
Substanzen	HEPES Lösung für Humantransporte	
	mM/l	g/mol
MgCl ₂ *6H ₂ O	1,0	203,3
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,25	147,0
NaH ₂ PO ₄	1,2	120,0
NaCl	135,4	58,44
HEPES	3	238,3
Glucose	12,2	180,2
KCl	5,0	74,55
pH	7,4	

Zur Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 M NaOH Lösung. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Präparationskrebs-und Versuchskrebslösung.

Substanzen	Präparationskrebslösung		Versuchskrebslösung	
	mM/l	g/mol	mM/l	g/mol
MgCl ₂ *6H ₂ O	1,2	203,3	1,2	203,3
CaCl ₂ *2H ₂ O	2,5	147,0	2,5	147,0
NaH ₂ PO ₄	1,2	120,0	1,2	120,0
NaCl	117	58,44	117	58,44
NaHCO ₃	25	84,01	20	84,01
Glucose	11	180,2	11	180,2
KCl	4,7	74,55	4,7	74,55
pH	7,4		7,3	

Zur Einstellung des pH-Wertes werden die jeweiligen Lösungen ca. 15 min mit Carbogen begast. Anschließend wird nach der Begasung CaCl₂*2H₂O zugegeben. Die Präparationskrebs-Lösung wird bei 4°C gelagert und enthält daher weniger NaHCO₃ als die Versuchskrebslösung, welche bei Raumtemperatur gelagert und verarbeitet

wird, um identische Bedingungen für das Präparat zu schaffen. Die Lagerung ist vier Tage möglich.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Chlorid und Bikarbonat-freien Versuchskrebslösung

Versuchskrebslösung ohne Chlorid und Bikarbonat

Substanz	mM/l	g/Mol
MgCl ₂ *7H ₂ O	1,06	246,47
CaCl ₂ *2H ₂ O	2,5	172,17
Na ₂ SO ₄	54,94	142,04
NaH ₂ PO ₄	1,22	119,98
K ₂ SO ₄	2,7	174,26
Glukose	11,54	180,2
Hepes	10	238,3
Mannitol	80	182,17
pH	7,4	

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH oder 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität wurde mit Mannitol eingestellt und lag final bei 292 mosmol/l. Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Zentrifugenröhrchen abgefüllt (Zentrifugenröhrchen, PP, 15 ml, natur, konischer Boden, graduert, steril Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich). Diese wurden bei 4°C gelagert. Die Chlorid-/Bikarbonatfreie Lösung wurde nur mit Luft mittels Aquarienpumpe (Air pump 200, EHEIM GmbH & Co. KG, Deizisau, Deutschland) im Versuch perfundiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Chlorid-freien Versuchskrebslösung

Chlorid-freie Krebs-Ringer-Lösung

Substanz	mM/l	g/Mol
Na ₂ SO ₄	60,5	142,04
K ₂ SO ₄	3,0	174,26
Mg ₂ SO ₄ *7H ₂ O	1,2	246,47
NaH ₂ PO ₄	1,3	119,98
Na H CO ₃	14,3	84,01
Glucose	12,7	180,2
Ca ₂ SO ₄ *2H ₂ O	2,3	172,17
Mannitol	60,5	182,17
pH	7,4	

Mannitol und Ca₂SO₄*2H₂O wurden erst nach Herstellung einer Stocklösung aller anderen Komponenten zugegeben. Die chloridfreie Versuchskrebslösung wurde mit Carbogen auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht. Die Osmolarität lag bei 281 mosmol/l. Die Lösung wurde steril filtriert und in Zentrifugenröhrchen abgefüllt (Zentrifugenröhrchen, PP, 15 ml, natur, konischer Boden, graduert, steril Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich). Diese wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 8: Zusammensetzung für die Herstellung der 100 mM KCl Krebs Lösung

100 mM KCl Krebs Lösung

Substanz	mM/l	g/Mol
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,2	203,3
CaCl ₂ * 2H ₂ O	2,5	147,0
NaH ₂ PO ₄	1,2	120,0
NaCl	17	58,44
NaHCO ₃	20	84,01
Glucose	11	180,2
KCl	100	74,55
pH	7,4	

Die Lösung wurde mit Carbogen auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Osmolarität lag bei 299 mosmol/l. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Tabelle 9: Zusammensetzung der 3 M KCl

3 M KCl

Substanz	mM/l	g/Mol
KCl	3000	74,551
Aqua bidestilliert	1 l	
pH	7,25	

Die Lösung wurde mit Kalium-Acetat auf einen pH-Wert von 7,25 titriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.5. Die Ussingkammer

2.5.1. Die Kammer, Aufbau und Funktion

Die Ussingkammer wurde bereits 1951 vom dänischen Zoologen Hans Ussing entwickelt, um das elektrophysiologische Verhalten des epithelialen Ionentransports zu untersuchen (Ussing und Zerahn, 1951).

Die für die Experimente verwendete Ussingkammer (Easy Mount Chambers EM-CSYS-4 und zwei EM-CSYS-2 Halterungen mit P2300 Kammern, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) bestand aus zwei Einzelkammer-Hälften, die an einer Aussparung miteinander in Verbindung standen. Die Mucosa/Submucosa-Präparate wurden in diese Aussparung so eingebaut, dass sich eine mucosale Versuchskammerhälfte auf der linken Seite sowie eine serosale Versuchskammerhälfte auf der rechten Seite ergaben. Die Sekretion wurde mit Hilfe der Voltage-Clamp-Methode bestimmt, was eine Messung des Ionenflusses über das Epithel ermöglichte (Abb. 6). Es war möglich, bis zu sieben Gewebestücke in einem

Versuchsdurchgang zu messen. In den Versuchen erfolgte die Stimulation meist mit einem physiologischen Standarddruck von 20 mmHg.

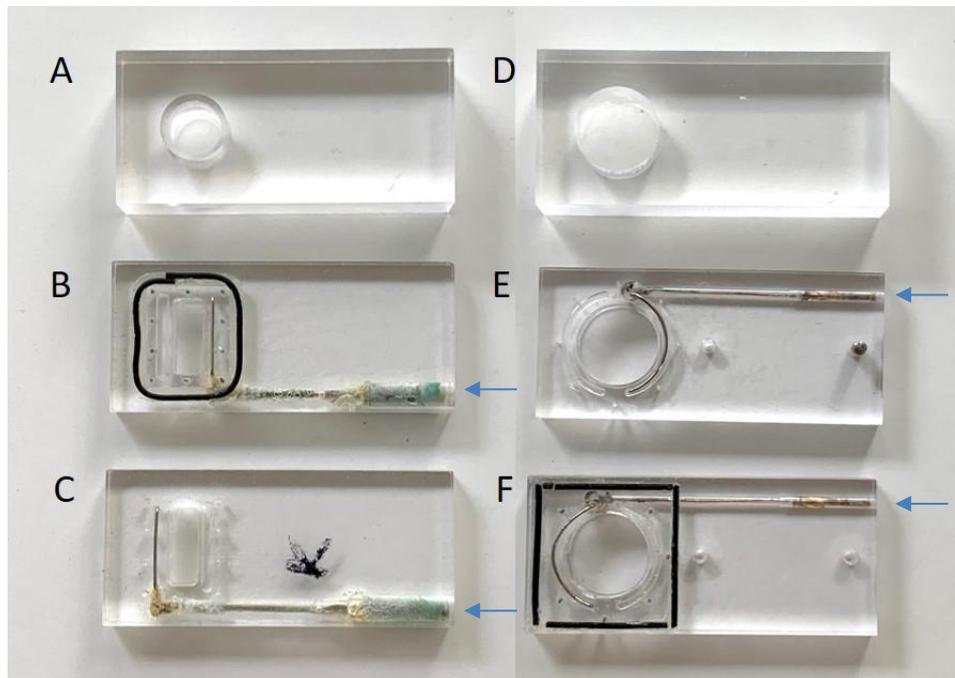


Abb. 6: Übersicht der selbstgebauten Gewebekammer. A: 0,5 cm² Kalibrierungsblock. B-C: 0,5 cm² Gewebekammerhälften. D: 1,08 cm² Kalibrierungsblock E-F: 1,08 cm² Gewebekammerhälften. Jede Gewebekammerhälfte verfügte über einen Platindraht zur elektrischen Stimulation (Pfeile), je eine Hälfte war mit Nadeln bestückt. In schwarz ist eine aufgebrauchte Gummidichtung zu sehen.

Für die Versuche wurden Gewebekammer selbst gebaut (Abb. 6). Hierzu wurden je Kammer zwei Gewebekammerhälften übereinander gesteckt. Die Plexiglas®-Hälften (PLEXIGLAS® XT Farblos 0A000 AMR, Röhm GmbH, Darmstadt, Deutschland) hatten die Abmessungen von 5 x 50 x 22,5 mm. Es wurden im Falle des 0,5 cm² Gewebekammers 8 oder 10 Löcher bzw. beim 1,08 cm² 8 Löcher je Gewebekammerhälfte um die große Aussparung herum gebohrt. In diese wurden auf 4 mm Länge gekürzte Nadeln (Insect pins white Gr. 1, Länge 39 mm, Durchmesser 0,40 mm, Ento Sphinx, Pardubice, Tschechien) in eine der Hälften eingesetzt. Zudem wurde in den Gewebekammer zum Zweck der elektrischen Stimulation des Gewebes ein Draht aus Platin/Iridium (90/10, 0,5 mm 901134, chemPUR Feinchemikalien und Forschungsbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt und (in Abb. 6 auf der rechten Seite des Gewebekammers mit blauen Pfeilen markiert) mit Goldsteckern (0,8 mm Goldkontakt ST+BU/Typ L Nr. 17050, Nessel Elektronik, Aspach, Deutschland) verlötet. Der Platindraht wurde gegenläufig um die Öffnung des Gewebekammers eingesetzt und war im Versuch im direkten Kontakt zum Versuchsgewebe (Abb. 6 B und C sowie E und F). Im Falle der elektrischen Stimulation wurde je ein Kabel über die Stecker je

Gewebehälfte mit dem Stimulator (siehe 2.5.2.) verbunden und Strom durch das Gewebe geleitet.

Um die Messfläche von 10 x 5 mm bei 0,5 cm² einer Gewebehälfte sowie der 1,08 cm² runden Messfläche wurde eine 1 mm dicke Dichtung (O-Ringe NBR 70 - Schnur 1 mm, Nr. 4219440, REIFF Technische Produkte GmbH, Reutlingen, Deutschland) mit Silikonkautschuk (Elastosil® N199, RTV-1, Wacker Chemie AG, München, Deutschland) aufgeklebt. Die Kalibrierungsblöcke aus massivem Plexiglas® hatten jeweils die Abmessungen von zwei aufeinandergesetzten Gewebehälften.

Die Kammerhälften wurden für den Versuch mit je 5 ml Versuchskrebslösung (Tabelle 5) befüllt und durch zwei Zugänge in den Plexiglasgefäßen mit Carbogen begast, um einen gleichmäßigen, physiologischen pH-Wert in der Versuchskrebslösung zu gewährleisten (Abb. 7). Zwischen den beiden Kammerhälften wurde ein zweiteiliger Plexiglas®-Gewebehälter in eine Aussparung eingeschoben (Abb. 6).

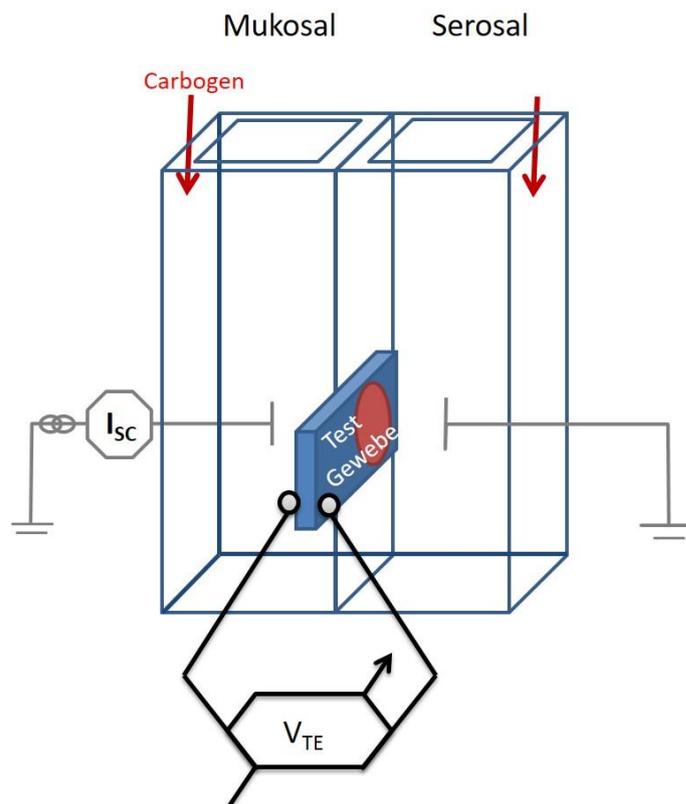


Abb. 7: Schema der Ussingkammer: Linke Seite: In blau ist der Gewebehälter mit dem Versuchsgewebe gezeigt, welcher zwischen den beiden Kammerhälften eingebaut wird, welche jeweils separat mit je 5 ml Versuchskrebslösung gefüllt werden. Die Begasung der jeweiligen Kammerhälfte ist als roter Pfeil gezeigt. Die in schwarz gezeigten Elektroden messen das transepitheliale Potential (V_{TE}) und die in grau gezeigten Elektroden applizieren den Kurzschlussstrom (I_{sc}). (Abbildung verändert von Allam 2014).

Auf diesem wurde das jeweilige Gewebepreparat auf der mucosalen Seite auf die Nadeln aufgebracht. Die andere Seite des Gewebehalters wurde aufgesetzt und

sicherte somit das Präparat gegen Verrutschen. An der Front jeder Kammerhälfte wurden durch je zwei Bohrlöcher die Messelektroden (P2020 Easy Mount Electrode Set, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) eingesteckt. Die gewebe nahen Elektroden (schwarz) dienten der Messung des transepithelialen Potentials (V_{TE}), die gewebe ferneren (grau) applizierten den Kurzschlussstrom (I_{SC}); (Abb. 7).

Zur Messung wurde in der Ussingkammer die Voltage-Clamp-Methode verwendet. Auftretende elektrische Potentiale, die durch ionale Bewegungen über das Gewebepräparat entstehen, werden bei dieser Methode durch Applikation eines Kurzschlussstromes auf Null gesetzt. Während des gesamten Versuches wurde der applizierte Kurzschlussstrom (I_{SC}) aufgezeichnet. Nach der Equilibrierungszeit wurde der basale Anfangswiderstand des Gewebes ermittelt. Durch Platinelektroden in den Gewebehaltern war eine elektrische Stimulation (elektrische Feldstimulation, EFS) der Präparate möglich. Hierbei werden die Nerven durch elektrische Impulse depolarisiert und die Ausschüttung von Neurotransmittern induziert. Die Stimulusparameter garantierten die ausschließliche Stimulation von Nerven (siehe 2.5.2.).

Durch den Transport der Ionen über das Epithelgewebe entsteht das V_{TE} . Bei der verwendeten Voltage-Clamp-Methode wird ein I_{SC} appliziert, welcher das V_{TE} auf 0 [mV] klemmt. Der I_{SC} entspricht dem Absolutwert des Stromflusses [μ A], welcher durch den Ionentransport erzeugt wird und kann somit auch eine indirekte Aussage über die Intaktheit des Gewebes geben. Der I_{SC} kann somit, wenn die Potentialdifferenz auf 0 [mV] geklemmt wird, den netto transzellulären Ionenfluss anzeigen (Sandle, 1998).

Die Definition des I_{SC} war hierbei:

$$I_{SC} = V_{TE}/R$$

I_{SC} : Kurzschlussstrom [A]

V_{TE} : Transepitheliales Potential [V]

R: Elektrischer Widerstand [Ω]

Der elektrische Widerstand wurde mindestens zweimal, nämlich zu Beginn und zum Ende eines jeden Versuches entsprechend des Ohm'schen Gesetzes bestimmt:

$$R = \Delta U / \Delta I$$

R: Elektrischer Widerstand [Ω]

ΔU : Änderung des elektrischen Potentials durch das Gewebe [V]

ΔI : Änderung der elektrischen Stromstärke durch das Gewebe [A]

Eine Zunahme des Kurzschlussstromes bedeutete im Versuch eine Anionensekretion ins Lumen bzw. eine Kationenabsorption aus dem Lumen. Umgekehrt wurde bei einer Anionenabsorption und Kationensekretion eine Abnahme des Kurzschlussstromes gemessen.

2.5.2. Versuchsdurchführung

Vor jedem Versuch wurden die Messelektroden mit den im Versuch verwendeten Lösungen kalibriert. Dazu wurde statt der Gewebehalter ein massiver Kalibrierungsblock (Selbstbau siehe 2.5.1) mit einem Durchlass entsprechend der Dimension der jeweiligen Messfläche (1,08 cm² oder 0,5 cm²) eingebaut, um die Kammerhälften zu verbinden. Anschließend wurden die Silber-Agar-Brücken-Elektroden eingebaut. Durch die Silber-Messelektroden mit Agar- 3 M KCl gefüllten Messspitzen (Herstellung Messspitze siehe 2.5.4) wurde ein geschlossener Messkreis mit der Krebslösung hergestellt. Für die Messungen des Kurzschlussstromes wurde der Voltage Current Clamp/Pulse Generator VCC MC6 und VVC MC2 (Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) mit einem Computer verbunden und dort mittels der Software Labchart (Version 7 und 8, Chart Software: AD Instruments, Spechbach, Germany) und dem Powerlab Adapter (AD Instruments, Spechbach, Germany) aufgezeichnet. Die Messwerte für Potential- und Stromstärkenänderung (ΔU und ΔI) wurden am Voltage Current Clamp/Pulse Generator abgelesen. Die Kalibrierung der gewebe-nahen Elektroden-Paare erfolgte auf 0 mV (schwarze Elektroden in Abb. 7).

Die gewebe-fernen Elektroden (graue Elektrode) konnten nur dann im Versuch verwendet werden, wenn sie im Voltage Current Clamp/Pulse Generator bei der Einstellung „Open“ und „Current“ und „Push to adjust“ einen Wert von über 60 mV aufwiesen. Ansonsten wurden die mit Agar und 3 M KCl gefüllten Messspitzen (Elektroden Tips P2023-20, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) ausgetauscht, falls nötig auch die gesamte Elektrode.

Für den Versuch wurde nach der Kalibrierung ein ca. 1 cm² großes Mucosa/Submucosa-Präparat mit Hilfe von Nadeln auf dem Gewebehalter fixiert (2.1.3) und anstatt des Kalibrierblockes in die jeweilige Ussingkammer eingebaut. Die Messflächen waren hierbei 1,08 cm² oder 0,5 cm² groß. Die Kammern wurden lediglich durch das Präparat und dessen Epithel getrennt. Nach dem Einbau des Gewebes musste dieses 60 min (Human) bzw. 45 min (Meerschweinchen) equilibriert werden. Im Anschluss wurde der Widerstand bestimmt, welcher u.a. der Bestimmung der Vitalität des Gewebes diente und den passiven Ionenfluss des Epithels aufzeigte. Im Falle eines Wertes von Null oder außerhalb des Messbereiches wurde das Gewebe nicht in den Experimenten verwendet. Im Anschluss wurde mittels Platinelektroden (elektrische Feldstimulation, EFS) eine neurale Stimulation durchgeführt. Die Spannung für die Stimulation wurde durch einen Spannungsgenerator (Grass SD-9 Grass-Telefactor, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA) appliziert. Die Einstellungen waren hierbei für Humangewebe eine Frequenz von 10 Hz bei einer Dauer von 1 ms sowie einer Spannung von 20 V, beim Meerschweinchen eine identische Frequenz jedoch mit einer Dauer von 0,5 ms und einer Spannung von 6 V. In den Halterungen der Ussingkammern von insgesamt 8 Einheiten zirkulierte zudem ein Wärmebad (WiseCircu Fuzzy Control System, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) welches die Gewebeproben und deren Versuchslösung auf konstant 37°C erwärmte. Für die Druckstimulation wurde ein selbstkonstruierter Silikonstöpsel in jeder Kammerhälfte oben aufgesteckt. Dieser enthielt ein Loch in Luer-Lock-Größe, welches während der Stimulation mit einer 1 ml Spritze (Injekt®-H 1 ml 9166203V, Braun AG, Melsungen, Deutschland) verschlossen wurde. Die Herstellung der Stöpsel erfolgte durch 3D-Druck der Gießform und 2-Komponenten-Flüssigsilikon (TFC Silikon Kautschuk Typ 1 Abformsilikon weich, Troll Factory Rainer Habekost e.K., Riede, Deutschland).

2.5.3. Material und Ablauf der Dehnungsstimulation

Um eine Dehnung des Gewebes zu bewirken wurde in der Einzelkammer der Druck mittels einer Spritzenapplikations-Pumpe durch einen Mikrocontroller (Arduino-Plattform) gesteuert (Abb. 8); (Michel und Schemann, 2020).

Die Pumpenhalterung wurde mit Hilfe eines 3D-Druckers (Ultimaker 3, Ultimaker, Utrecht, Niederlande) nach einer Opensource Anleitung erstellt (Michel und Schemann, 2020; Wijnen et al., 2014). Der Stempel der verwendeten Spritze wurde in

der hinteren Halterung fest eingespannt. Diese lief auf einem Schlitten, welcher durch einen Stepper-Motor, angesteuert über den Treiber EasyDriver von Brian Schmalz, vor- und zurückbewegt werden konnte (Michel und Schemann, 2020).

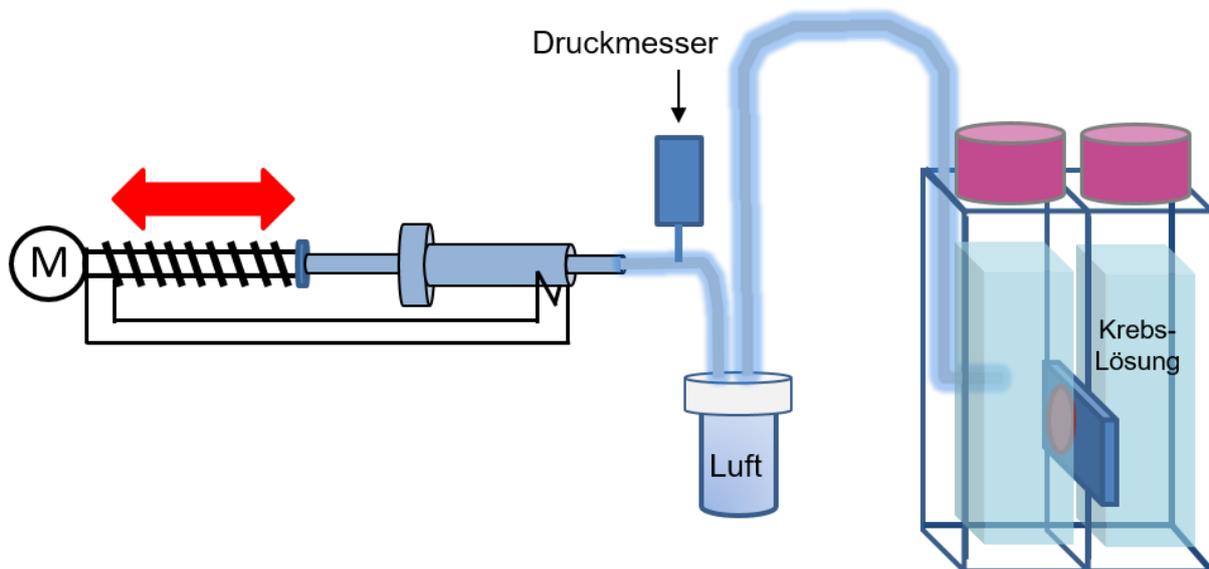
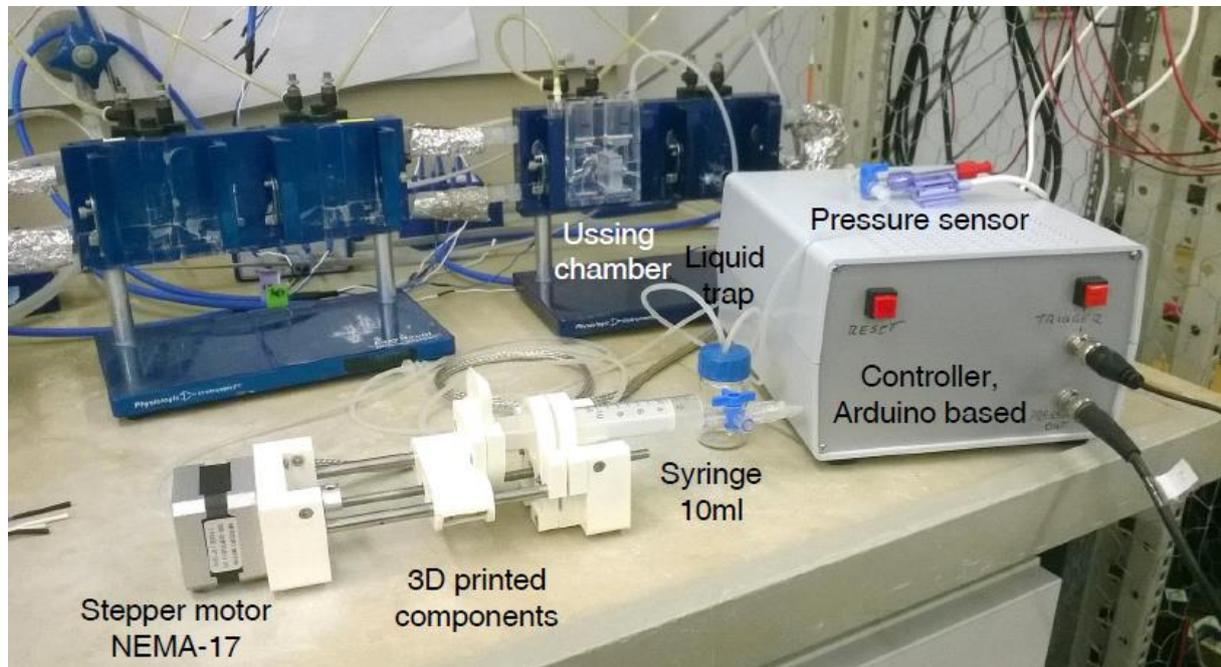


Abb. 8: Pumpe zur Druckapplikation an der Ussingkammer. Oben: Gezeigt sind die genutzten Komponenten für die Pumpe, Stepper Motor (M), 3D gedruckte Komponenten der Spritzenhalterung, 10 ml Spritze mit 3-Wege Hahn, Schlauchsystem mit Flüssigkeitsfalle (Glas), Druckmesser, Arduino Steuergerät und Ussingkammer mit Kalibrierblock (Michel und Schemann, 2020). Unten: Schema des oben gezeigten Aufbaus. Zur Druckapplikation wurden die Kammern mit Silikonstöpseln verschlossen und die mittels Mikrocontroller (Arduino) gesteuerte Pumpe erzeugte den jeweils eingegebenen Druck auf der serosalen Seite des Gewebes durch Injektion des jeweiligen Volumens. Der Druck wurde durch den Druckmesser erfasst (Verändert von Allam 2014).

Genutzt wurde zur Steuerung ein Makro auf Basis der Open-Source-Software von Arduino IDE (Tabelle 3), welches von Dr. Klaus Michel geschrieben wurde (Michel und Schemann, 2020). Die Spritze wurde mit Schläuchen (Perfusionsschläuche Tygon

flexible plastic tubing 3,2 mm, Saint-Gobain, Frankreich), einer Flüssigkeitsfalle (Gewindeflasche Klarglas 45x27 mm, 15 ml) und einem Dreiwege-Hahn (Discofix, Braun, Melsungen, Deutschland) verbunden. Der Dreiwege-Hahn erlaubte die Öffnung dieses Schlauchsystems beim Aufstecken an den Begasungslöchern der Ussingkammer, so dass eine ungewollte Druck- oder Unterdruckapplikation vermieden werden konnte. Eine aufgezogene Spritze (Injekt® Solo 10 ml Luer Spritze, Braun AG, Melsungen, Deutschland) injizierte solange Luft über ein Schlauchsystem, bis die Höhe des eingegebenen Drucks erreicht wurde. Dieser Druckunterschied wurde mit Hilfe eines Druckmessers im Schlauchsystem (PendoTECH, Single Use Pressure Sensor, PRESS-S-000) erfasst. Dieser war über Powerlab (ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) mit dem PC verbunden. Mithilfe der Software Labchart und der Arduino Steuerungssoftware konnte der Druck auf einen vorher definierten Wert kalibriert und eingestellt werden. Die Injektion und die anschließende Druckentlastung erfolgten nach Befehlseingabe automatisiert. Vorab festgelegt werden konnte auch die Dauer der Applikation sowie die Pumpgeschwindigkeit in Umdrehungsschritten des Pumpenantriebs.

2.5.4. Herstellung der Elektrodenspitzen

Für die Herstellung der Elektrodenspitzen wurden 3-4 g Agar-Agar (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 100 ml 3 M KCl Lösung (Tabelle 9) gelöst. Diese 3-4%-ige Lösung wurde langsam auf 150 °C mittels heizbarem Magnetrührer (RCTbasic, IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland) in einem 50 ml Becherglas mit Uhrenglasdeckel erhitzt und blasenfrei gelöst. Anschließend wurden 30 – 40 µl der noch flüssigen Lösung mit einer Spritze (2 ml single use syringe, Henry Schein Inc., Melville, NY, USA) und einer Kanüle (Sterican® 0.90 x 40 mm Gr 1., B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die jeweiligen Messspitzen (Elektrode Tips P2023-20, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) gegeben. Ca. 1 cm der Spitze war hierbei gefüllt. Die Spitzen mit dem erkalteten Agar wurden mit einer identischen Spritzenkombination mit 3 M KCl blasenfrei überschichtet und in Gefäße mit 3 M KCl gegeben. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C, bei Verwendung auch für kurze Zeit bei Raumtemperatur.

2.6. Versuche mit alternativer Versuchslösung

Um die Funktion einzelner Ionen zu untersuchen, wurden Versuchskrebslösungen ohne Chlorid und ohne Chlorid/Bikarbonat eingesetzt (Tabellen 6 und 7). Vor Beginn des Versuchs wurde mit dieser Lösung die Anlage kalibriert und die Einstellungen notiert. Im Anschluss wurde die Anlage wie gehabt mit der Standard Versuchskrebslösung (Tabelle 5) befüllt und erneut kalibriert. Die alternativen Lösungen wurden in einem 15 ml-Röhrchen (Zentrifugenröhrchen, PP, 15 ml, natur, konischer Boden, graduiert, steril, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich) bei 37°C im Wasserbad (Thermomix, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) vorgewärmt. Nach erfolgter erster Druckstimulation mit Standardlösung wurde diese mit einem von Dr. Dagmar Krüger erprobten Y-Silikonschlauch (Tygon flexible plastic tubing 1,6 mm E-3603, Saint Gobain Performance, France) und Y-Verbinder (Miniature Barbed Polypropylene Fittings Model 6365-90, Cole-Parmer Instrument Company, USA) abgezogen und die Kammer danach sehr langsam mit der alternativen Lösung befüllt, um keine Dehnungen durch Druckschwankungen zu generieren. Das Gewebe wurde unter Einstellung der notierten Kalibrierungserstwerte vor erneuter Druckapplikation ca. 30 min equilibriert.

2.7. Einsatz von Amilorid

Amilorid gehört zur Gruppe der diuretischen Medikamente. Durch Amilorid können die ENaC (1.2.) und weitere Amilorid-sensitive Na⁺-Kanäle blockiert werden (Sariban-Sohraby und Benos, 1986). Somit konnte in den Experimenten die Beteiligung dieser Kanäle ausgeschlossen werden. Dies war insofern von Bedeutung, da eine Erhöhung des Kurzschlussstroms auch durch Absorption von Na⁺-Ionen erfolgt. Durch die ENaC-Blockade ist auch der verbliebene Kurzschlussstrom primär durch eine Anionensekretion zu erklären.

Amilorid (A-7410, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, D8418, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gelöst. Die 1 mM Stocklösung wurde bei -20 °C gelagert. Die finale Konzentration in der Ussingkammer lag bei 10 µM. Die Zugabe erfolgte vor Stimulation des Gewebes auf dessen mucosaler Seite.

2.8. Versuche mit Tetrodotoxin

Tetrodotoxin (TTX) bindet und blockiert spezifisch spannungsaktivierte schnelle Natriumkanäle (Nav 1.1; 1.2; 1.3; 1.6 und 1.7); (VGSC), welche auf Neuronen zu finden sind (Abb. 2). Dadurch, dass keine Na⁺-Ionen mehr in die Zelle gelangen können, kommt es zu einer Inhibition von Aktionspotentialen und somit zur Blockade der neuronalen Antworten (Lee und Ruben, 2008; Narahashi, 2008). In den Versuchen sollte mittels TTX-Applikation beurteilt werden, ob es sich bei der Antwort auf den Dehnungsstimulus um eine neural vermittelte Antwort handelt.

TTX (BN 0518, BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland) wurde in bidestilliertem H₂O gelöst und als 10⁻³ M Stocklösung bei -20°C gelagert. Für den Versuch wurde eine finale Konzentration von 1 µM TTX verwendet. TTX wurde im Versuch serosal (und lediglich in bestimmten Meerschweinchenversuchen mucosal) zugegeben. Das Gewebe wurde vor erneuter Dehnungsstimulation ca. 30 min mit der TTX-haltigen Lösung inkubiert.

2.9. Versuche mit ω-Conotoxin GVIA

Das aus der Meeresschnecke *Conus geographus* gewonnene Gift ist ein spezifischer Blocker spannungsabhängiger N-Typ-Calciumkanäle (Kasai et al., 1987; Olivera et al., 1991). Eine Blockade des Calcium-Einstroms durch ω-Conotoxin GVIA verhindert auch die Freisetzung von Transmittern, wie ACh, präsynaptisch (Schemann et al., 2002).

Das als Feststoff gelieferte ω-Conotoxin GVIA (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) wurde in deionisiertem Wasser gelöst und als 100 µM Stocklösung bei -20°C gelagert. Um die synaptische Übertragung im Experiment zu blockieren wurde eine Konzentration von 500 nM verwendet und durch serosale Zugabe in die Ussingkammer appliziert. Die Inkubationsdauer betrug 30 min.

2.10. Versuche mit Piroxicam

Piroxicam ist ein Prostaglandin-Synthese-Inhibitor, welcher selektiv und reversibel das Enzym Cyclooxygenase hemmt (Earnet et al., 1992).

Piroxicam wurde in den Experimenten eingesetzt, um die Beteiligung von Prostaglandinen an der dehnungsinduzierten Sekretion zu überprüfen. Die Inkubationsdauer betrug 30 min. Piroxicam (P-5654, Sigma-Aldrich, Taufkirchen,

Deutschland) wurde in Chloroform gelöst und als 100 mM Stocklösung bei -20 °C gelagert. In den Versuchen wurde Piroxicam in 10 µM Konzentration bei serosaler Gabe eingesetzt.

2.11. Versuche mit Neostigmin

Neostigmin ist ein Acetylcholinesterase-Inhibitor. Die Hemmung des Enzymes Acetylcholinesterase führt dazu, dass ACh im synaptischen Spalt nicht mehr abgebaut und somit angereichert wird, so dass sich Wirkungsdauer und Menge des Neurotransmitters erhöhen. Die Folge ist eine indirekte Wirkungssteigerung von ACh an spezifischen Rezeptoren (Fisher, 1999). Da besonders im humanen Colon die Acetylcholinesterase sehr aktiv ist und eine cholinerge Komponente an der Sekretion überdecken kann, wurde bei einigen Versuchen der Einfluss von Neostigmin auf die dehnungsinduzierte Sekretion untersucht (Krueger et al., 2016). Wie in 1.2. beschrieben spielt ACh zudem eine wichtige Rolle bei der Ca²⁺-induzierten Chlorid-Ionensekretion im Darm, wobei ACh an den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor M3 der Epithelzellen bindet (Barrett, 2008).

Die 10⁻² M Stocklösung (N-2001, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde bei +4°C gelagert. Es wurde eine finale Konzentration von 1 µM in der Versuchskammer bei serosaler Applikation genutzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 min.

2.12. Versuche mit Atropin

Atropin agiert bei einer Konzentration von 1 µM als kompetitiver, reversibler Antagonist an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren in der Ussingkammer (Bhattacharjee et al., 2013; Krueger et al., 2016). Atropin (A-0257, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde in bidestilliertem H₂O als 10⁻³ M Stocklösung bei -20°C gelagert. Die finale Konzentration von 1 µM wurde serosal zugegeben und mindestens 20 min inkubiert.

2.13. Versuche mit Tropicsetron

Bei Tropicsetron handelt es sich um einen spezifischen 5-Hydroxytryptamine Typ-3 (5-HT₃)-Rezeptor-Antagonisten (Zulkifli et al., 2019). Tropicsetron (ICS-205-930 Sandoz, Basel, Schweiz) wurde in Versuchskrebslösung gelöst und als 10⁻³ M Stocklösung bei -20°C gelagert. Es wurde eine finale Konzentration von 1 µM eingesetzt. Die Zugabe erfolgte serosal und mindestens 20 min vor Stimulation. In den

Experimenten wurden die Gewebe mittels mucosalem Druck stimuliert um vor allem die enterochromaffinen Zellen zu aktivieren und die 5-HT Sekretion auszulösen. Tropisetron wurde eingesetzt, um die Beteiligung von 5-HT₃ an der dehnungsinduzierten Sekretion zu ermitteln.

2.14. Versuche mit Gadolinium

Gadolinium blockiert einige dehnungsaktivierte Ionenkanäle und somit auch neuronale Reizweiterleitung (Kunze et al., 1999; Weber et al., 2001). In den Versuchen wurde Gadolinium(III)-chlorid Hexahydrat (g-7532, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in bidestilliertem H₂O gelöst und als 100 mM Stocklösung bei +4°C gelagert. Die finale Konzentration lag bei 100 µM bei serosaler Applikation. Die Inkubationsdauer betrug 30 min. In den Versuchen wurde Gadolinium genutzt, um die Beteiligung der dehnungsaktivierten Ionenkanäle bei der dehnungsinduzierten Sekretion zu überprüfen.

2.15. Versuche mit Prostaglandin E₂

Im Meerschweinchen wirken Prostaglandine sekretionsfördernd (Frieling et al., 1997). Analog zu den Prostaglandin D₂ Experimenten von Frieling et al. wurde in den Versuchen dieser Arbeit der Versuchskrebslösung 1 µM Prostaglandin E₂ (P5640, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf der serosalen Seite der Kammern zugegeben (Frieling et al., 1997, 1992). Zur Herstellung der 10⁻³ M Stocklösung wurde Prostaglandin E₂ in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. PGE₂ wurde in den Versuchen eingesetzt, um die Rolle von Prostaglandin bei der Chlorid-Ionensekretion des Humanendarmes zu untersuchen.

2.16. Versuche mit Netzeinbau

Es wurde ein Netz mit 150 µm Maschenweite (Nytal PA-9-150 Netz, Sefar AG, Heiden, Schweiz) für die Versuche verwendet. In Meerschweinchen-Versuchen wurde vorab auch ein Netz mit Maschenweiten von 250 µm getestet, welches jedoch wegen Undichtigkeit der Gewebehalter durch das zu starke Material nicht genutzt werden konnte. Die Netze wurden auf der mucosalen Seite des Gewebes auf den Gewebehalter fixiert und mit einer Präparationsschere (T 14028-10, FST, Heidelberg, Deutschland) zugeschnitten. Im Anschluss wurden die Gewebe wie unter 2.1.3 beschrieben darüber aufgebracht, sodass die Mucosa gegen das Netz orientiert war. Im Versuch konnte sich das Gewebe bei Druckapplikation somit weniger ausdehnen

und wurde gegen das Netz gedrückt und dadurch komprimiert. Die Netze wurden nach jedem Versuch erneuert.

2.17. Versuche mit Mikrofiltern

Da in den Versuchen mit Netz (2.16.) ein Hineindrücken der Mucosa in die Maschen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden stattdessen Mikrofilter zur Verhinderung der Dehnung genutzt. Die verwendete MF-MilliporeTM-Membrane (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aus gemischten Celluloseestern (MCE) wies eine Porengröße von 0,45 µm auf, um Ionen passieren lassen zu können. Die Membrane wurde identisch zu den Netzen unter 2.16. auf die Nadeln der Gewebehalter aufgebracht. Die Filter wurden nach jedem Versuch erneuert.

2.18. Beispiel der Versuchsprotokolle bei Applikation

1. Elektrische Stimulation
2. Druckstimulation (Kontrolle)
 - Erhöhung des Druckes in der Kammer serosal oder mucosal (mmHg), dadurch Dehnung des Gewebes
3. Gabe des pharmakologischen Stoffes, dabei ca. 30 min Inkubationszeit
4. Druckstimulation
5. Weitere Pharmakologie
6. Druckstimulation
7. Elektrische Stimulation

Zwischen den Stimulationen wurden Erholungsphasen für das Gewebe von 20-30 min gemacht, jeweils abhängig vom Zeitpunkt an dem die Basislinie ihren Ausgangswert wieder erreicht hatte.

2.19. Auswertung der Stimulations-Versuche und Beispielgraphen

Die Aufzeichnung und Auswertung der Ussingkammer Versuche erfolgte wie in 2.5.2. beschrieben mittels der Software Labchart (Version 7 und 8, Chart Software, AD Instruments, Spechbach, Germany). Hierbei wurde die Amplitude bis zum Erreichen des Antwortmaximums und die Dauer der gesamten Antwort bestimmt.

Die Amplitude wurde als Differenz der y-Achse als $\Delta \mu\text{A}$ zwischen Startpunkt und Maximalpunkt der Kurve bestimmt. Dies entspricht der gemessenen Stromstärkenänderung der Sekretion bei Stimulation und wird daher in dieser Arbeit als sekretorische Antwort bezeichnet (Abb. 9).

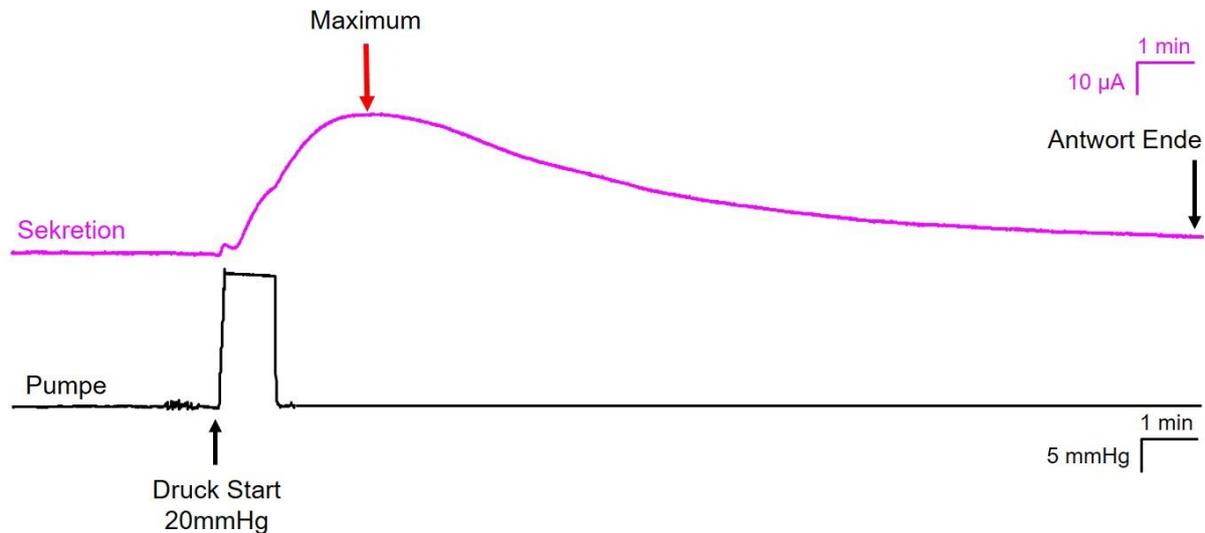


Abb. 9: Beispielgraph einer serosalen Druckstimulation mit 20 mmHg im Colon sigmoideum (Mensch). Die pinke Kurve zeigt die gemessene Sekretion, die y-Achse entspricht dabei der Stromstärke in μA und die x-Achse der Zeit in min. Die schwarze Kurve stellt den Graph der Pumpe dar, wobei y den mmHg und x ebenfalls der Zeit in min entspricht. Zunächst wird ein Druckstimulus am Marker „Start“ gegeben, welcher einem Druck von 20 mmHg entspricht. Dieser wird 60 s gehalten und dann wieder reduziert (Rampe). Die Druckantwort der pinken Sekretionskurve erreicht an der Markierung ihr Ende und kehrt auf Basallinienniveau zurück.

Da bei Versuchen an Humangewebe oft stärkere Veränderungen der Basislinie auftraten, wurde bei ihnen eine Korrektur der $\Delta \mu\text{A}$ durchgeführt. Die Dauer vom Start der Stimulation bis zum Maximum wurde hierbei in die entgegengesetzte Richtung der x-Achse, somit der Zeit vor der Stimulation, berechnet. Die Differenz der steigenden oder fallenden Basallinie in μA innerhalb dieses Zeitabschnittes vor Stimulation wurde vom $\Delta \mu\text{A}$ (Maximalwert) abgezogen oder hinzugerechnet.

Zudem wurde die Gesamtdauer der Stimulation bestimmt. Hierzu wurde der Differenzwert in Sekunden auf der x-Achse vom Startpunkt bis zum Wiedererreichen der Basallinienhöhe vor Stimulation oder eines Verlaufes mit geringer oder ohne Steigung der Kurve ermittelt.

Die gewonnenen Werte wurden anschließend mittels Microsoft Excel (Microsoft Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA) weiterverarbeitet und in tabellarische Form gebracht. Diese wurden zur statistischen Auswertung in das Programm SigmaPlot 12.5 (Systat Software GmbH, San Jose, USA) übertragen.

Korrelationen wurden mittels Pearson Produkt Moment Korrelation durchgeführt, wobei signifikante Bezüge $p < 0,05$ sein mussten. Die weiteren Daten wurden entweder „zwei Gruppen gepaart“, „zwei Gruppen ungepaart“ oder „mehrere Gruppen“ untereinander getestet.

Je nachdem, ob normalverteilte oder nicht normalverteilte Daten vorlagen, wurde bei „zwei Gruppen gepaart“ der Paired t-test oder der Wilcoxon Signed Rank Test verwendet. Im Falle von drei gepaarten Stimulationen wurden die Tests zweifach durchgeführt und im Anschluss eine Signifikanz statt ab $p < 0,05$ erst bei $p < 0,025$ ermittelt (Bonferroni Korrektur). Dies war notwendig, da im Falle einer One Way Analysis of Variance (ANOVA) eine ungewollte Testung der ersten und letzten Stimulation miteinander stattgefunden hätten.

Bei „zwei Gruppen ungepaart“ wurden normalverteilt der t-test und nicht normalverteilt der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet.

Im Falle eines Vergleiches von mehr als zwei Gruppen wurde bei Normalverteilung die ANOVA oder bei nicht Normalverteilung der Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks mit evtl. Post Hoc Test (Dunn's) verwendet. Auch hier wurden Testergebnisse $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet.

Die gezeigten Ergebnisse sind in den Texten immer als Mediane mit 25. und 75. Perzentile dargestellt. Die darauf basierenden Box-Plots sind ebenfalls als Mediane mit 25. zu 75. Perzentile dargestellt. Die n-Zahlen der Versuche entsprechen den verwendeten Geweben. Wenn nicht anders angegeben sind signifikante Ergebnisse $p < 0,05$.

Das Erstellen der Graphen (Box Plots (Q25, Q75) und Scatter Plots) in SigmaPlot erfolgte mit der Funktion: Create Graph und der Wahl des jeweilig gewünschten Typen. Diese Graphen wurden in Microsoft Powerpoint (Microsoft Powerpoint 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA) exportiert. Dort wurden sie entgruppiert und bearbeitet (Einfügen→Inhalte Einfügen→Als Windows Metadatei).

Die Erstellung der Kurven erfolgte mittels Labchart 8, Igor Pro (WaveMetrics Inc., Portland, USA) und Powerpoint. Die Experiment-Datei im .adicht Format wurde in Labchart in eine Igor-Datei (.pxp) exportiert. Die Abbildungen von einzelnen Stimulationen und überlagerten Stimulationen eines Kanales wurden in IgorPro mit Hilfe eines von Dr. Klaus Michel geschriebenen Makros beschriftet und übereinandergelegt. Mit der Funktion: Graph→Packages→Append Calibrator, wurden die Achsenlegenden eingefügt. Die fertige Abbildung wurde im Anschluss in Powerpoint exportiert (Edit→Export Graphics). Balken- und Tortendiagramme wurden direkt in Excel aus den dort gespeicherten Daten erstellt und in Powerpoint exportiert.

2.20. Auswertung des Dehnungsvolumens in μl

Um das Dehnungsvolumen des Gewebes im Versuch zu errechnen, werden vier Schritte basierend auf dem Gesetz von Boyle und Mariotte durchlaufen. Dieses besagt, dass sich ein Volumen V einer Gasmenge umgekehrt proportional zum Druck p verhält (Schüle, 1925).

Schritt 1: Bestimmen des Gesamtgasvolumens V ohne Gewebe, welches im Messsystem immer vorherrscht. (Messsystem=Schläuche, Spritze, Flüssigkeitsfalle, flüssigkeitsgefüllte Ussingkammer mit starrer Wand zwischen den Hälften, umgestellte Formel von Boyle & Mariotte)

$$V = (p + \Delta p) * \frac{\Delta V}{\Delta p}$$

$p=713$ mmHg, entsprechend des Luftdrucks in Freising umgerechnet vom Meeresniveau auf 500 Höhenmeter (Wetterstation Freising LFL, Agrarmeteorologie Bayern)

Mehrfache μl Messung in 500 μl Schritten ($=\Delta V$). Zu jeder Injektion wurde der entsprechende Druck in mmHg (Δp) mit dem Druckmesser (PendoTECH, Single Use Pressure Sensor, PRESS-S-000) im Schlauchsystem bestimmt. 55 Messpaare mit fünf Kammern wurden jeweils in die Formel eingesetzt und das Gesamtvolumen V bestimmt.

Der sich ergebende Mittelwert lag bei $31 \pm 0,5$ ml. Dieser Wert wurde für alle folgenden Berechnungen verwendet.

Schritt 2. Messung des Injizierten Volumens im Versuch mit Gewebe= ΔV_{inj} , welches zum Erreichen von (Δp) injiziert wurde

Es gilt: Pumpengeschwindigkeit 200 [$\mu\text{l/s}$] \triangleq eingestelltes Injektionsvolumen/Zeit

Schritt 3: Errechnen des benötigten Volumens im Falle einer starren Wand ohne Gewebe für einen bestimmten mmHg Wert $=\Delta V$

$$\Delta V = \frac{V * \Delta p}{(p + \Delta p)}$$

$$\Delta V [\mu\text{l}] = \frac{31000[\mu\text{l}] * \Delta p [\text{mmHg}]}{713[\text{mmHg}] + \Delta p[\text{mmHg}]}$$

Schritt 4: Das reine Dehnungsvolumen V_{Dehn} für das Gewebe ergibt sich aus:

$$V_{\text{Dehn}} = V_{\text{inj}} - \Delta V$$

Um eine prozentuale Oberflächenänderung bestimmen zu können, wurden die μl Werte anhand der Kugelkalotte als Modell bestimmt (Abb. 10). Das Modell wurde durch Dr. Klaus Michel mittels der Software IgorPro erstellt.

$$\text{Volumen der Kugelkalotte: } V = \pi h \left(\frac{a^2}{2} + \frac{h^2}{6} \right)$$

h = Höhe der Kalotte (wurde zu beliebigem V bestimmt)

a = Radius des Grundkreises, bei $1,08 \text{ cm}^2$ Messfläche somit $a = 5,89 \text{ mm}$

Somit ergibt sich die Oberfläche der Kalotte: $M = \pi(a^2 + h^2)$

Daher ergibt sich: $0,524h^3 + 0h^2 + 54,5h - V = 0$

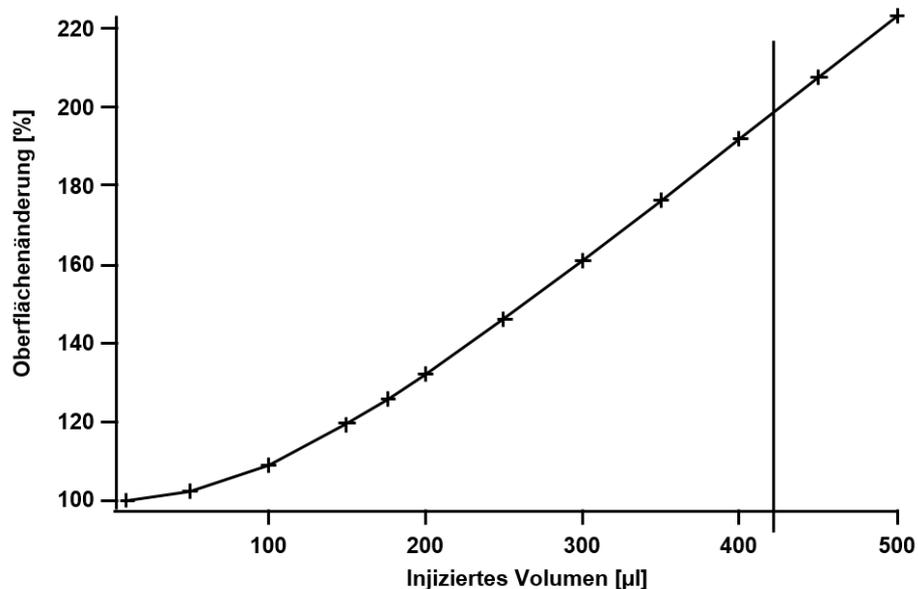


Abb. 10: Modell der Kugelkalotte. Dient der Berechnung des Volumens in Abhängigkeit von der Oberflächenveränderung (y-Achse) und injiziertem Volumen (x-Achse). Die Obergrenze der berechenbaren Flächenänderung anhand dieses Modells lag bei $421,5 \mu\text{l}$ (Linie).

3. Ergebnisse

3.1. Experimente mit Meerschweinchengewebe

3.1.1. Diaphragmagewebe bei Druckapplikation

Anhand dieser Versuche wurde die angewendete Ussing-Methode zur Induktion der dehnungsinduzierten Erhöhung des Kurzschlussstromes überprüft. Für die Versuche wurde als nicht sekretierendes Epithel Meerschweinchen-Diaphragma verwendet, welches als Negativ-Kontrolle diente und eventuelle falsch positive Werte offenlegen sollte. Es wurden Gewebehalter mit Messflächen von $0,5 \text{ cm}^2$ verwendet, welche mit einem gleichbleibenden Druck von 20 mmHg serosal 60 s lang stimuliert wurden (Abb. 11). Die sich ergebenden Kurzschlussströme lagen bei $0,0$ bis $1,0 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Bei einem Vergleich, ob sich die Antworten von Null unterscheiden, ergab sich bei keiner dieser drei repetitiven Stimulationen ein signifikanter Unterschied (Tabelle 12 und 37).

Somit zeigten die Diaphragmagewebe keine falsch positiven Signale auf den Druckstimulus. Auch die Ausbeulung des Gewebes durch den Druck löste keine Signale aus. Der Druckstimulus mit einem Plateau von 60 s Dauer bei gleichbleibendem Druck wurde in diesen Versuchen als Rampenstimulation bezeichnet.

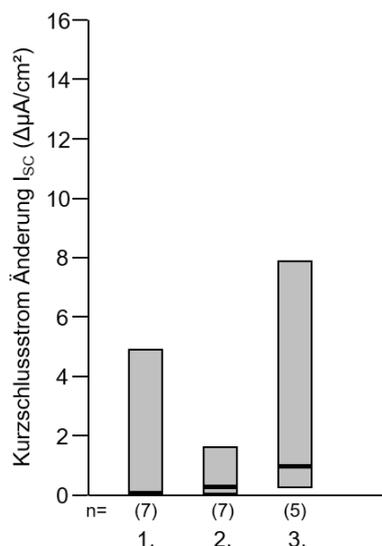


Abb. 11: Änderung des Kurzschlussstroms I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) bei dreifach repetitiven serosalen 20 mmHg Druck-Stimulationen des Diaphragmas. Versuche mit Meerschweinchen - Diaphragma bei kleinen ($0,5 \text{ cm}^2$) Messflächen zeigten keine Unterschiede zu Null.

Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks/Tukey

3.1.2. Optische Beurteilung der Dehnung in der Halbkammer

Im nächsten Schritt sollte die durch Druckapplikation ausgelöste Dehnung (Ausbeulung) des Gewebes beurteilt werden. Dazu wurde der Gewebehalter an einer Kammerhälfte fixiert und Drücke appliziert. Es erfolgte eine optische Beurteilung der Dehnung (Abb. 12). Eine standardisierte Messung der Dehnung war mit diesem Aufbau jedoch nicht möglich und erfolgte deshalb in späteren Versuchen durch Berechnung des injizierten Luftvolumens beim Aufbau beider Kammerhälften.

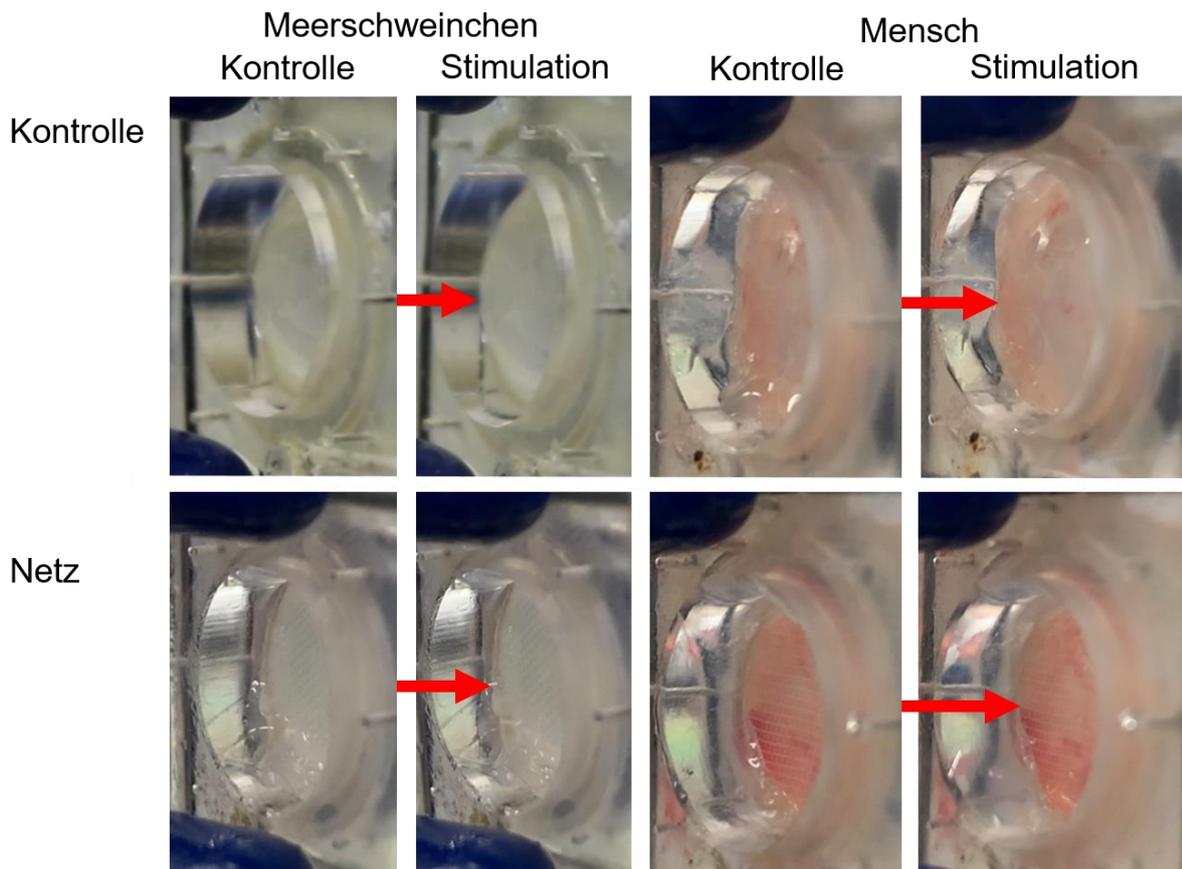


Abb. 12: Seitliche Ansichten der 1,08 cm² Gewebehalter. Der Aufbau mit nur einer Halbkammer ermöglichte eine direkte Beobachtung der Dehnung von Mucosa/Submucosa-Präparaten von Meerschweinchen und Mensch. Diese wurde bei Einbau von Netzen an der Mucosaseite beurteilt (untere Reihe). Die Pfeile markieren die Spitze der Dehnungskalotte des jeweiligen Gewebes. Die Netze verringerten die Ausdehnung.

Die Beurteilung mit einem eingebauten Meerschweingewebe, ergab unmittelbar nach Beginn der Druckstimulation eine sichtbare Dehnung des Gewebes. Das Gewebe wurde mit 20 mmHg Druck gedehnt, die als Rampenstimulation appliziert wurde. Sobald das Plateau des Drucks erreicht war, zeigten sich keine Veränderungen der Dehnung mehr, weder weitere Zunahme noch Abnahme. Bei Abpumpen des Volumens reduzierte sich die Dehnung, wie erwartet, unmittelbar wieder.

Die Dehnung wurde auch mit Humangewebe beurteilt. Diese zeigten eine geringere Ausdehnung auf denselben Druckimpuls im Vergleich zum Meerschweinchendarm. Die Dehnung folgte der Rampenstimulation und erreichte den Peak mit Erreichen der 20 mmHg, blieb 60 s stabil und reduzierte sich unmittelbar mit der Druckreduktion.

In den späteren Versuchen wurden auch Netze (Abb. 12) und Mikrofilter auf der mucosalen Seite des Gewebes im Gewebehalter eingebaut, um die Dehnung zu reduzieren und eventuelle Reaktionen auf Druck alleine zu untersuchen. Das Netz mit 150 μm Maschenweite wurde hierbei zuerst in die Halbkammer eingebaut und die Dehnungsstärke optisch beurteilt. Es zeigte sich durch diesen Einbau eine reduzierte Dehnung im Vergleich zum nativen Gewebe. Um die Dehnung noch weiter zu reduzieren wurden statt des Netzes Mikrofilter mit einer Porengröße von 0,45 μm verwendet. Diese zeigten nur noch eine minimale Dehnung im Vergleich zu Kontrolle und Netz.

Basierend auf den Erkenntnissen stellte sich die Frage nach der Reproduzierbarkeit der gemessenen dehnungsinduzierten Sekretionsantworten.

3.1.3. Reproduzierbarkeit der serosalen Stimulationen bei großen und kleinen Messflächen

Anhand von 30 Mucosa/Submucosa-Präparaten wurden dreifach repetitive Druckstimulationen bei serosaler Applikation von 20 mmHg Rampe in ihrer Sekretionsantwort verglichen und auf ihre Reproduzierbarkeit hin überprüft. Die Erhöhungen der Sekretionsantwort mit den Gewebehaltern der kleinen Messfläche (0,5 cm^2 grau) zeigten Unterschiede von der ersten zur zweiten Stimulation (Abb. 13 A). Die der größeren Messflächen (1,08 cm^2 , grün) wiesen keine Unterschiede voneinander auf (Abb. 13 B, Tabelle 12 und 37). Für pharmakologische Untersuchungen mit Meerschweingewebe wurden somit nur aufeinander folgende Stimulationen verglichen.

Im Fall der großen Messfläche zeigte sich im Beispielgewebe ein sehr steiler, unmittelbar nach dem Stimulationsstart erfolgender Anstieg der Sekretion (Abb. 14). Das Maximum von wurde noch während der Druckstimulation erreicht, was in den meisten Geweben der Fall war. Die Antwort war dabei bisphasisch. Die Rückkehr zur Basislinie erfolgte erst einige Minuten nach Beendigung des Druckstimulus. Die gezeigten Messkurven sind als absolute Werte dargestellt.

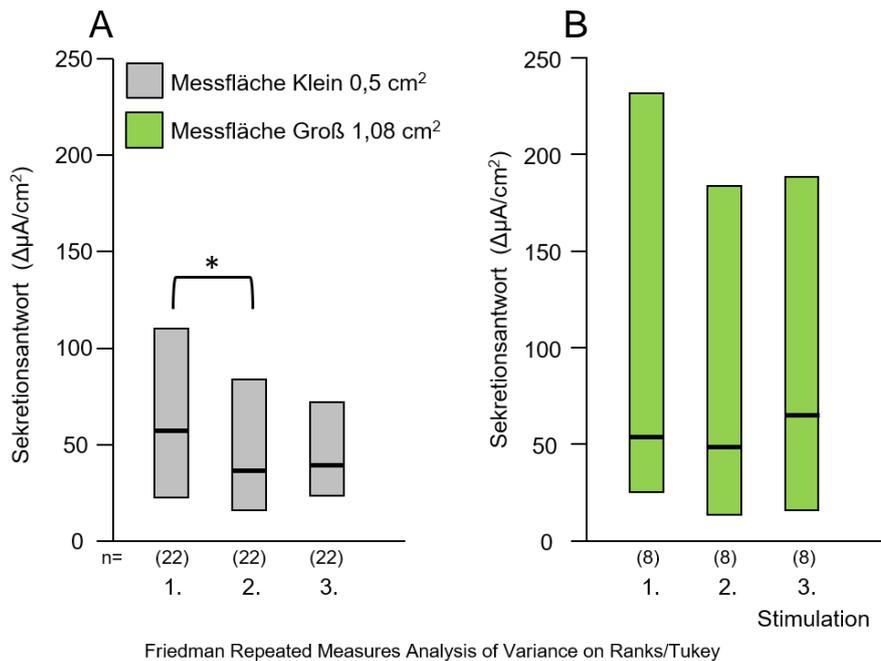


Abb. 13: Dehnungsinduzierte Sekretionsantworten ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) bei dreifach repetitiver 20 mmHg Rampendruckstimulationen bei Mucosa/Submucosa-Präparaten sind bei den großen Gewebehaltern nicht unterschiedlich, bei den kleinen Gewebehaltern sind jedoch die erste und zweite Stimulation signifikant verschieden ($p < 0,05$). A: Versuche mit kleinen $0,5 \text{ cm}^2$ Gewebehaltern zeigten eine Abnahme von erster zu zweiter Stimulation ($p < 0,05$). B: Versuche mit großen $1,08 \text{ cm}^2$ Gewebehaltern zeigten keine Unterschiede.

Bei der kleinen Messfläche ergab sich ebenfalls eine Erhöhung der Druckantwort, jedoch war hier die Steigung der Kurve nicht so steil wie beim gezeigten großen Gewebehalter. Das Maximum wurde ebenfalls noch während der Druckstimulation erreicht.

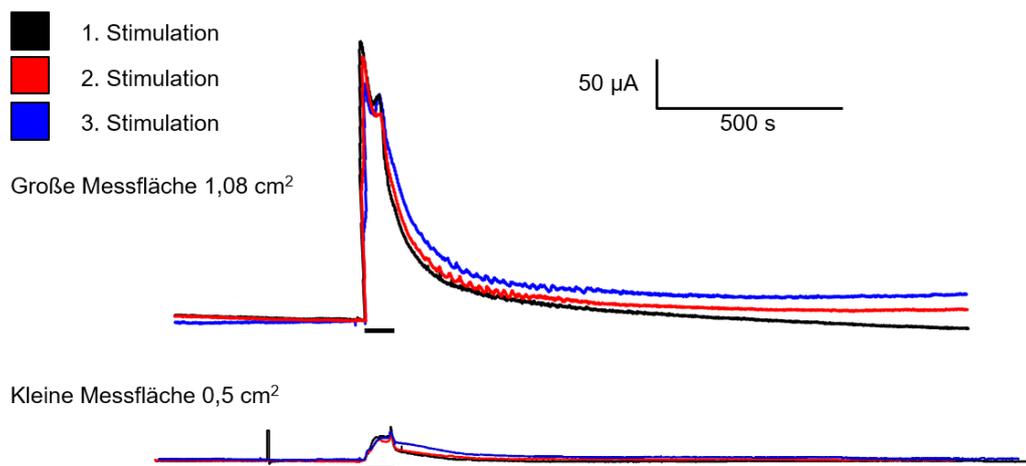


Abb. 14: Beispielgraphen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort zweier Gewebe bei dreifach repetitiver serosaler 20 mmHg Rampenstimulation bei großen ($1,08 \text{ cm}^2$) und kleinen Messflächen ($0,5 \text{ cm}^2$). Die y-Achse zeigt die Sekretionsantwort in μA , die x-Achse die Dauer in Sekunden. Die Stimulation ist als Balken unter der Kurve dargestellt.

3.1.4. Vergleiche der Gewebehalter-Messflächen

Um herauszufinden, ob sich kleine ($0,5 \text{ cm}^2$) und große ($1,08 \text{ cm}^2$) Messflächen von der ersten zur dritten Stimulation unterscheiden, wurden Mucosa/Submucosa-Präparate (Abb. 15 A) wie auch Ganzwand-Präparate (Abb. 15 B) des Meerschweinchens untersucht. Die Ganzwand-Präparate wurden eingesetzt, um herauszufinden, ob der myenterische Plexus ebenfalls an der Steuerung der dehnungsinduzierten Sekretion beteiligt sein könnte.

Es wurde kleine gegen große Messfläche je Stimulation derselben Gewebe getestet (Abb. 15 A). Bei der ersten bis dritten Stimulation ergaben sich für diese Mucosa/Submucosa-Präparate keine Unterschiede zwischen kleinen und großen Messflächen (Tabelle 12 und 37).

Die Vergleiche der kleinen gegen die großen Messflächen der Ganzwand-Präparate bei der ersten Stimulation, der zweiten Stimulation sowie der dritten Stimulation zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 15 B).

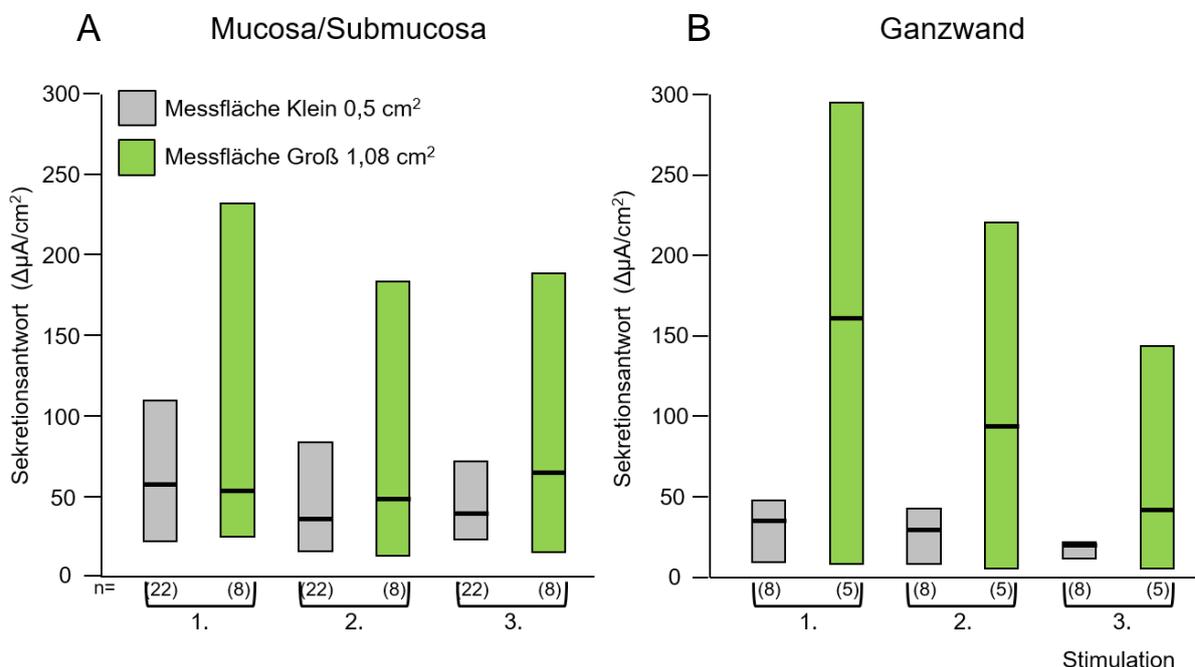


Abb. 15: Vergleiche der Messflächen von $0,5 \text{ cm}^2$ (klein) und $1,08 \text{ cm}^2$ (groß) bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei Mucosa/Submucosa-Präparaten sowie Ganzwand-Präparaten. Gezeigt sind die Sekretionsantworten in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf einen 20 mmHg serosalen Rampenstimulus von 60 s Dauer. A: Mucosa/Submucosa-Präparationen bei dreifach repetitiver Stimulation zeigten keine Unterschiede zwischen den kleinen und großen Messflächen der ersten bis dritten Stimulation. B: Ganzwand-Präparate bei dreifach repetitiver Stimulation zeigten keine Unterschiede zwischen den kleinen und großen Messflächen der ersten bis dritten Stimulation.

Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen großen und kleinen Messflächen je Stimulation bei den Mucosa/Submucosa-Präparaten sowie bei den Ganzwandgeweben.

3.1.5. Abhängigkeit der Antwort von der Gewebevorspannung

Die Größe der Messfläche zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort, jedoch ergab sich daraus die Frage, ob die Gewebevorspannung auf dem Gewebehalter einen Unterschied verursacht. In weiteren Versuchen wurde daher untersucht, ob die Gewebevorspannung selbst und auch bei der neural vermittelten, dehnungsinduzierten Sekretionsantwort Differenzen aufweist.

In den bisher publizierten Experimenten bei den Tiermodellen Ratte und Meerschweinchen wurde eine nervale Komponente der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort durch TTX-Applikation identifiziert (Diener und Rummel, 1990; Frieling et al., 1992).

In den hier gezeigten Versuchen wurden beim Aufbringen der Mucosa/Submucosa-Präparate auf die 0,5 cm² Gewebehalter die Gewebe maximal gespannt oder wurden locker ohne jede Spannung über der Messfläche des Gewebehalters aufgebracht. Es erfolgte eine 20 mmHg starke serosale Rampendruckapplikation. Nachfolgend wurde jeweils TTX serosal zugegeben und mit der Kontroll-Stimulation unmittelbar vor der Zugabe verglichen.

Die Beispielgraphen der Gewebe mit und ohne Vorspannung zeigten ähnliche Antwortverläufe, zum einen ein steiler Anstieg unmittelbar nach Stimulationsstart, zum anderen eine zusätzliche spätere Antwort als zweiten Peak noch während der Dehnung (Abb. 16). Mit Druckreduktion und abnehmender Dehnung kam es zu einer langsamen Rückkehr zur Basislinie. Die Kontrollen und die TTX-Antworten unterschieden sich im Falle der maximalen Spannung nicht, im Falle ohne Spannung ist die Antwort unter TTX leicht reduziert. Die Dauer veränderte sich jedoch nicht.

Die entnommenen Gewebe ohne Vorspannung und bei maximaler Spannung entstammten, im Hinblick auf bestmögliche Vergleichbarkeit, denselben sieben Meerschweinchen.

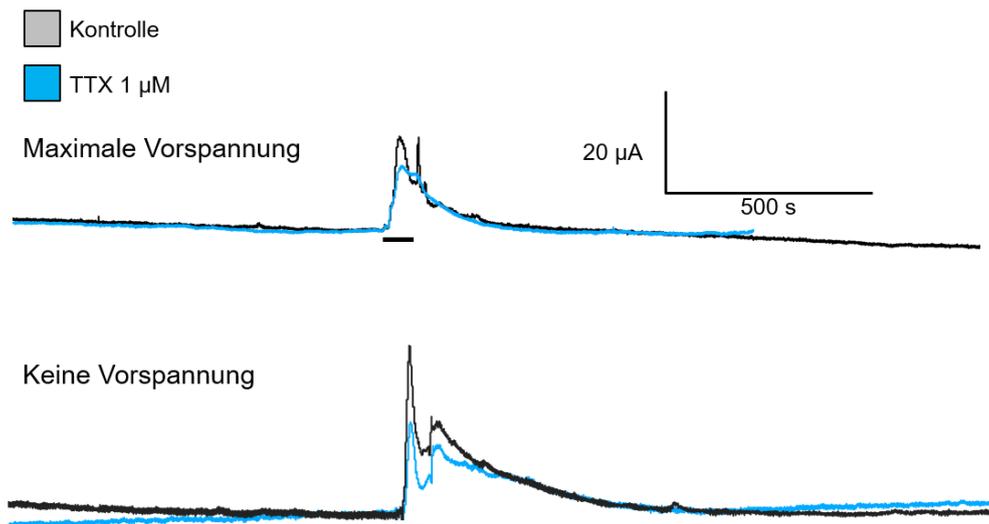


Abb. 16: Beispielgraphen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei 20 mmHg serosalem Rampendruck bei maximal vorgespanntem und Gewebe ohne Vorspannung bei Kontrollstimulation und in TTX 1 µM. Die y-Achse zeigt die Sekretionsantwort in µA, die x-Achse die Dauer in Sekunden. Die Druckapplikation ist mit einem Balken unter der Kurve markiert.

Die Kontrollen der unterschiedlich gespannten Gewebe wurden verglichen und zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Dehnungsstimulation in TTX zeigte bei stark gespannten Geweben keine Unterschiede zur Kontrolle, bei den Geweben ohne Vorspannung jedoch eine TTX-Sensitivität (Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,025$); (Abb. 17 A, Tabelle 13 und 37).

Um die Frage zu beantworten, ob sich die Sekretionsantwort bei Aktivierung der enterischen Neurone durch elektrische Stimulation je nach vorgespanntem Gewebe unterscheidet, wurden dieselben Meerschweinchengewebe schon vor Dehnungsstimulation mittels Platindraht-Elektroden auf dem Gewebe elektrisch stimuliert (Abb. 17 B). Der Vergleich von maximal gespannten und Geweben ohne Vorspannung ergab keinen Einfluss auf die elektrisch induzierte Sekretionsantwort (Tabelle 13 und 37).

Da sich nur bei Geweben ohne Vorspannung eine geringe nervale Beteiligung ergab, wurde in den folgenden Versuchen darauf geachtet, eine gleichmäßige, mittlere Spannung der Gewebe zu verwenden.

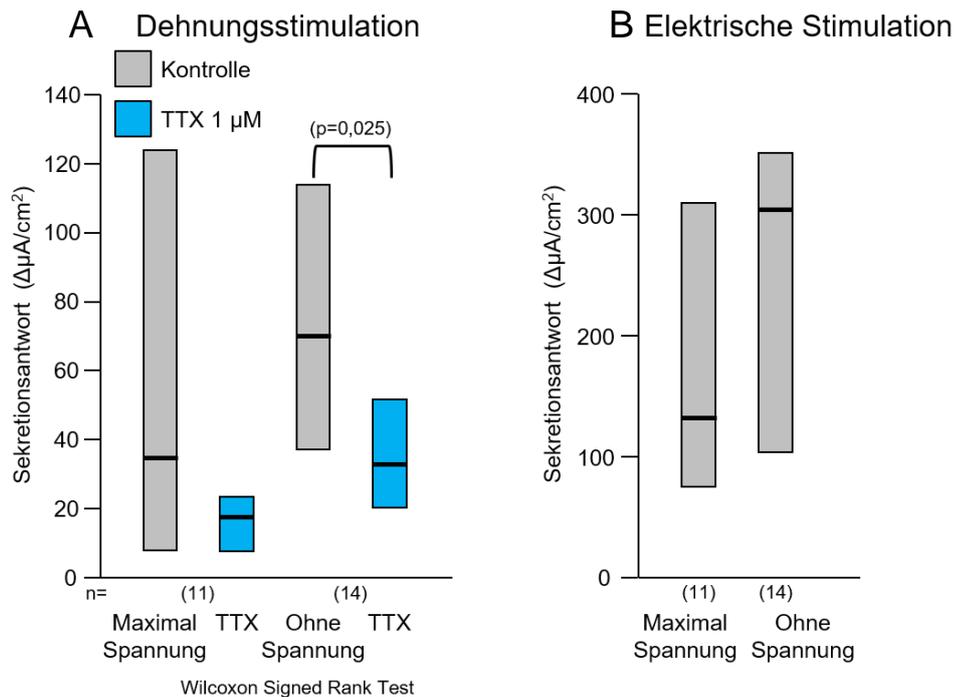


Abb. 17: Vergleich der dehninginduzierten sowie der elektrisch stimulierten Sekretionsantwort bei unterschiedlicher Gewebevorspannung. Gezeigt sind die Sekretionsantworten in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ von Versuchen mit Gewebehaltern bei $0,5 \text{ cm}^2$ Messfläche. A: Gezeigt sind die Sekretionsantworten bei maximal gespanntem und Gewebe ohne Vorspannung, wobei die Gewebe ohne Spannung TTX-sensitiv waren ($p<0,05$). B: Gezeigt ist die durch elektrische Stimulation induzierte Sekretionsantwort der Gewebe bei maximaler und ohne Vorspannung, welche sich nicht signifikant unterschied.

3.1.6. Einfluss der Geschwindigkeit der Druckapplikation

Um herauszufinden welche weiteren Parameter bei der Applikation Unterschiede hervorrufen könnten, wurde auch der Volumenstrom der Pumpe und somit die Geschwindigkeit, mit welcher die Drücke im Gewebe erreicht werden, untersucht.

Hierzu wurden Gewebe bei 10 mmHg und 20 mmHg Druck in kleinen Gewebehaltern ($0,5 \text{ cm}^2$) gemessen. Zusätzlich sollte auch geklärt werden, ob diese Pumpenunterschiede sich auf die TTX-Antwort auswirken. Als Kontrollen wurden die Druckstimulationen unmittelbar vor TTX-Gabe mit denen in TTX verglichen. Bei der schnellen Einstellung der Pumpe wurde mit $500 \mu\text{l}/\text{s}$ appliziert, wobei der Druck 5 s lang gehalten wurde. Bei Geweben mit langsamer Applikation wurde mit $50 \mu\text{l}/\text{s}$ gearbeitet und 60 s 20 mmHg gehalten. Bei mittlerer Geschwindigkeit erfolgte die Rampenstimulation mit einem Volumenstrom von $200 \mu\text{l}/\text{s}$ und wurde 60 s bei einem maximalen Druck von 20 mmHg gehalten.

Bei der schnellen Druckapplikation war der Anstieg der Sekretionsantwort viel schneller als bei der langsamen Druckapplikation (Abb. 18 A). Da der Druck nur 5 s gehalten wurde, wurde das Maximum erst während der Druckreduzierung erreicht. Der

Druckaufbau und -abbau erfolgte so schnell, dass die Antwort monophasisch war. Die Antwort endete nach ca. 95 s. Nur die schnelle Druckapplikation von 20 mmHg war TTX-sensitiv, wodurch zumindest bei diesem Stimulationsprotokoll eine nervale Komponente nachweisbar war.

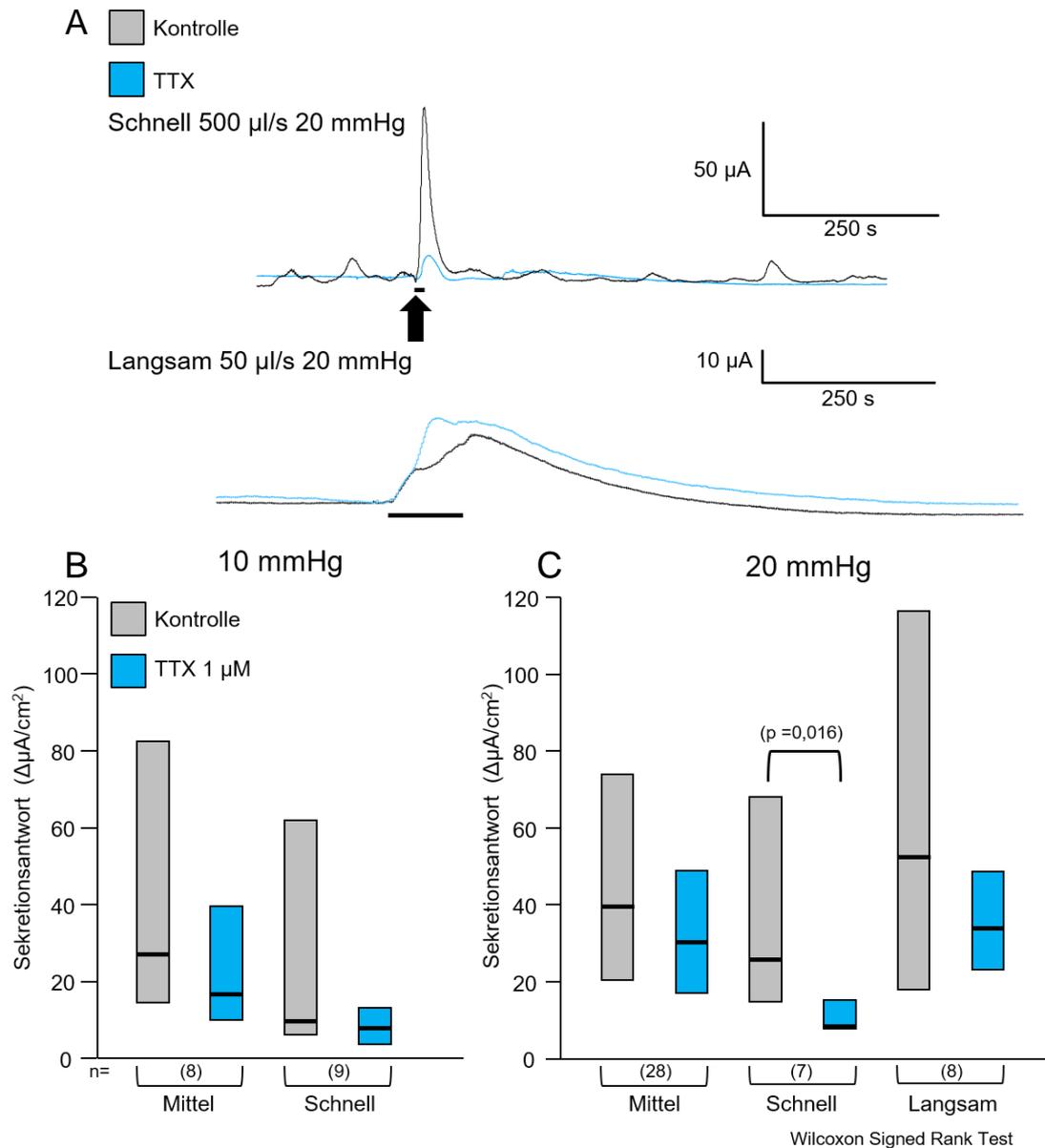


Abb. 18: Vergleiche unterschiedlicher Pumpengeschwindigkeiten bei 10 und 20 mmHg serosaler Druckapplikation. Gezeigt sind die Sekretionsantworten in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei kleinen Gewebehaltern ($0,5 \text{ cm}^2$). A: Beispielgraphen der Sekretionsantworten (in μA , y-Achse) bei schneller und langsamer 20 mmHg Applikation pro Dauer (in Sekunden, x-Achse). Den Start der Druckapplikation markiert ein Pfeil, die Druckstimulation selbst zeigt der schwarze Balken. Der Druck wurde 5 s in den schnellen Stimulationen und 60 s in den langsamen Stimulationen gehalten. B: Gezeigt sind die Sekretionsantworten bei 10 mmHg in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei mittlerer Geschwindigkeit (200 $\mu\text{l}/\text{s}$) sowie bei schneller Applikation (500 $\mu\text{l}/\text{s}$). Es zeigte sich kein Einfluss auf die TTX-Antwort. C: Gezeigt sind die Sekretionsantworten bei 20 mmHg in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei mittlerer (200 $\mu\text{l}/\text{s}$), bei schneller (500 $\mu\text{l}/\text{s}$) sowie langsamer (50 $\mu\text{l}/\text{s}$) Applikation. Es zeigte sich eine TTX-Sensitivität bei der schnellen Applikation, jedoch nicht bei mittlerer oder langsamer Geschwindigkeit ($p < 0,05$).

Die langsame Druckapplikation hingegen wies einen flacheren Anstieg sowie eine längere Dauer bis zur Rückkehr zur Basislinie auf (Abb. 18 A).

Die Antwort war biphasisch mit stark abgeflachten Peaks. Die Gesamtdauer der Antwort betrug ca. 750 s. Die langsame Druckapplikation erhöhte die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort auf bis zu $178,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, die schnelle Druckapplikation erreichte mit bis zu $181,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ vergleichbare Werte. Die langsame Kurve zeigte geringe Unterschiede zwischen der Kontrollstimulation und in TTX was bei der Hälfte der Kurven der Fall war.

Bei 10 mmHg Druckapplikation mit mittlerer Geschwindigkeit wurden Sekretionsantworten von $27,2 (14,2/82,6) \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen (Abb. 18 B). Bei schnellerer Druckapplikation ergaben sich vergleichbare Sekretionsantworten. Unabhängig von der Geschwindigkeit der Druckapplikationen waren die Antworten nicht TTX-sensitiv (Tabelle 13 und 37).

Auch die Antworten nach 20 mmHg Druckapplikationen waren vergleichbar und zwar unabhängig davon, ob der Maximaldruck sehr schnell oder eher langsam erreicht wurde. Nur bei der schnellen Applikation von 20 mmHg Druck zeigte sich eine ausgeprägte nervale Komponente, da die Antwort in TTX um ca. 60% reduziert war ($p=0,016$); (Abb. 18 C).

3.1.7. Mucosa/Submucosa- und Ganzwand-Präparate im Vergleich

Es ergab sich die Frage, ob der MP zusammen mit dem SMP eine Rolle bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort spielt. Somit wurden Versuche mit kleinen und großen Mucosa/Submucosa-Präparaten und Ganzwand-Präparaten mit kleiner und großer Messfläche mit und ohne TTX durchgeführt (Abb. 19). Hierbei wurde eine Stimulation unmittelbar vor TTX-Applikation als Kontrolle verwendet. Zudem sollte geklärt werden, ob die Wirkung von TTX auf die dehnungsinduzierte Sekretion davon abhängt, ob dieser Nervenblocker serosal oder mucosal appliziert wird.

Bei den Ganzwandgeweben zeigten sich keine Unterschiede der Antworthöhe der dehnungsinduzierten Sekretion im Vergleich zu den Mucosa/Submucosa-Präparaten. Die abgebildeten Kurven der Ganzwandgewebe zeigten zudem eine niedrigere Antwort bei mucosaler Applikation verglichen mit der serosalen (Abb. 19 A). Weder serosale noch mucosale Applikation von TTX ergaben eine TTX-Sensitivität. Sowohl das Gewebe der serosalen als auch der mucosalen Applikation wiesen eine

biphasische Antwort auf, welche in TTX bestehen blieb. Die mucosale Kurve zeigte einen geringen Unterschied der Sekretionsantwort zwischen Kontrolle und TTX.

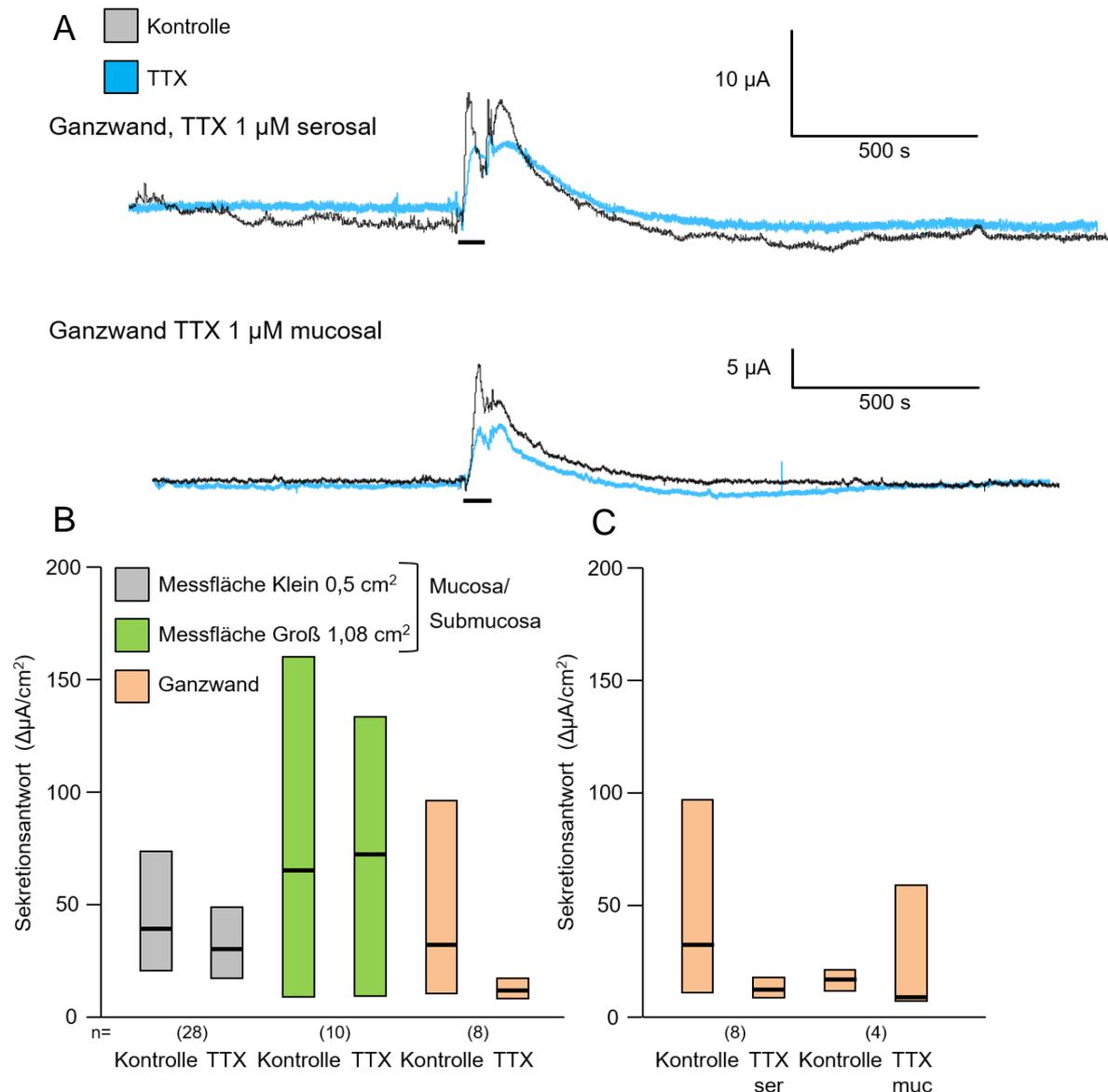


Abb. 19: Vergleiche von Mucosa/Submucosa- und Ganzwand-Präparaten bei serosal 20 mmHg Rampenstimulation. A: Beispielgraphen der Sekretionsantworten der Ganzwandgewebe von Kontrollen sowie in TTX bei dessen serosaler und mucosaler Applikation. Die y-Achse zeigt die Sekretionsantwort in μ A, die x-Achse die Dauer in Sekunden. Der Balken markiert die Druckstimulation. B: Gezeigt sind die Sekretionsantworten von Mucosa/Submucosa-Präparaten in kleinen und großen Messflächen sowie den gemischten Größen der Messflächen des Ganzwandgewebes. Verglichen wurden Kontrollen gegen TTX-Inkubation wobei sich keine TTX-Sensitivität zeigte. C: Gezeigt sind die Sekretionsantworten bei gemischter Größe der Messflächen der Kontrollstimulation gegenüber TTX-inkubierter Sekretionsantwort bei serosaler und mucosaler Gabe. Es zeigte sich in keiner Gruppe eine TTX-Sensitivität.

Der Vergleich der Ergebnisse der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort von Kontrolle gegen TTX ergab bei den kleinen und großen Messflächen der Mucosa/Submucosa-Präparate sowie bei den Ganzwandgeweben gemischter Größe keine TTX-Sensitivität (Abb. 19 B, Tabelle 13 und 37).

Im Falle einer separaten Betrachtung der großen Messflächen der Ganzwand-Präparate ergaben sich im $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ Werte von 42,1 (5,0/144,3) bei der Kontrolle und 11,4 (6,6/20,5) in TTX (n=5); (nicht in der Abb. 19 dargestellt). Auch diese Werte zeigten keine TTX-Sensitivität.

Zudem wurde der Effekt von TTX bei serosaler und mucosaler Gabe auf Ganzwand-Präparate untersucht und ferner darauf, ob sich in der Wirksamkeit Unterschiede zeigten. Weder bei serosaler Applikationsseite noch bei mucosaler Gabe von TTX ergaben sich TTX-Sensitivitäten und somit keine nervale Beteiligung an der dehnungsinduzierten Sekretion (Abb. 19 C).

3.1.8. Ist die sekretorische Antwort abhängig von der Dehnung und Kompression des Gewebes

Da TTX keine Wirkung auf die dehnungsinduzierte Sekretion hatte, erschien eine Reaktion der dehnungssensitiven sensorischen Neurone ausgeschlossen. Mechanosensitive Neurone lassen sich in dehnungssensitive wie auch kompressionssensitive Gruppen einteilen (Kreutz, 2018). Daher stellte sich die Frage, ob die Kompression der Gewebe eine andere Sekretionsantwort erzielen könnte.

Um die Dehnung zu reduzieren und etwaige Effekte einer Kompression auf die Sekretionsantworten und Dehnungsvolumen hin zu untersuchen, wurden in den folgenden Versuchen Netze mit 150 μm Maschenweite und Filter mit 0,45 μm Porengröße in die Gewebehalter eingebaut. Da die Dehnung in diesen Versuchen reduziert wurde, ist in den Versuchen mit Netz oder Filter nun von einer druckinduzierten Sekretionsantwort die Rede.

Bei Verwendung eines Netzes im Gewebehalter war die Sekretionsantwort des gezeigten Gewebes schneller als bei der Verwendung des Filters (Abb. 20 A). Die Antwort war biphasisch und das Maximum wurde noch während der Druckstimulation erreicht.

Die Verwendung eines Filters im Gewebehalter hingegen wies einen flachen Anstieg der Antwort auf. Die biphasische Antwort mit abgeflachten Peaks erreichte ein niedrigeres Maximum der Sekretionsantwort im Vergleich zu Druckstimulationen mit Netz. Die Hälfte der Gewebe mit Filter zeigte eine monophasische Sekretionsantwort.

Die prozentuale Abnahme der Sekretionsantwort lag bei 36,5 % von Geweben ohne Netz oder Filter zum eingebauten Netz, sowie bei 82,7% von Geweben ohne Netz oder Filter zu Verwendung des Filters (Abb. 20 B, Tabelle 13 und 37). Per Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks und Post-Hoc Test (Dunn's) wurde offengelegt, dass die Antworten von Geweben ohne Netz oder Filter zu Filter sowie Netz zu Filter signifikant reduziert waren ($p < 0,001$).

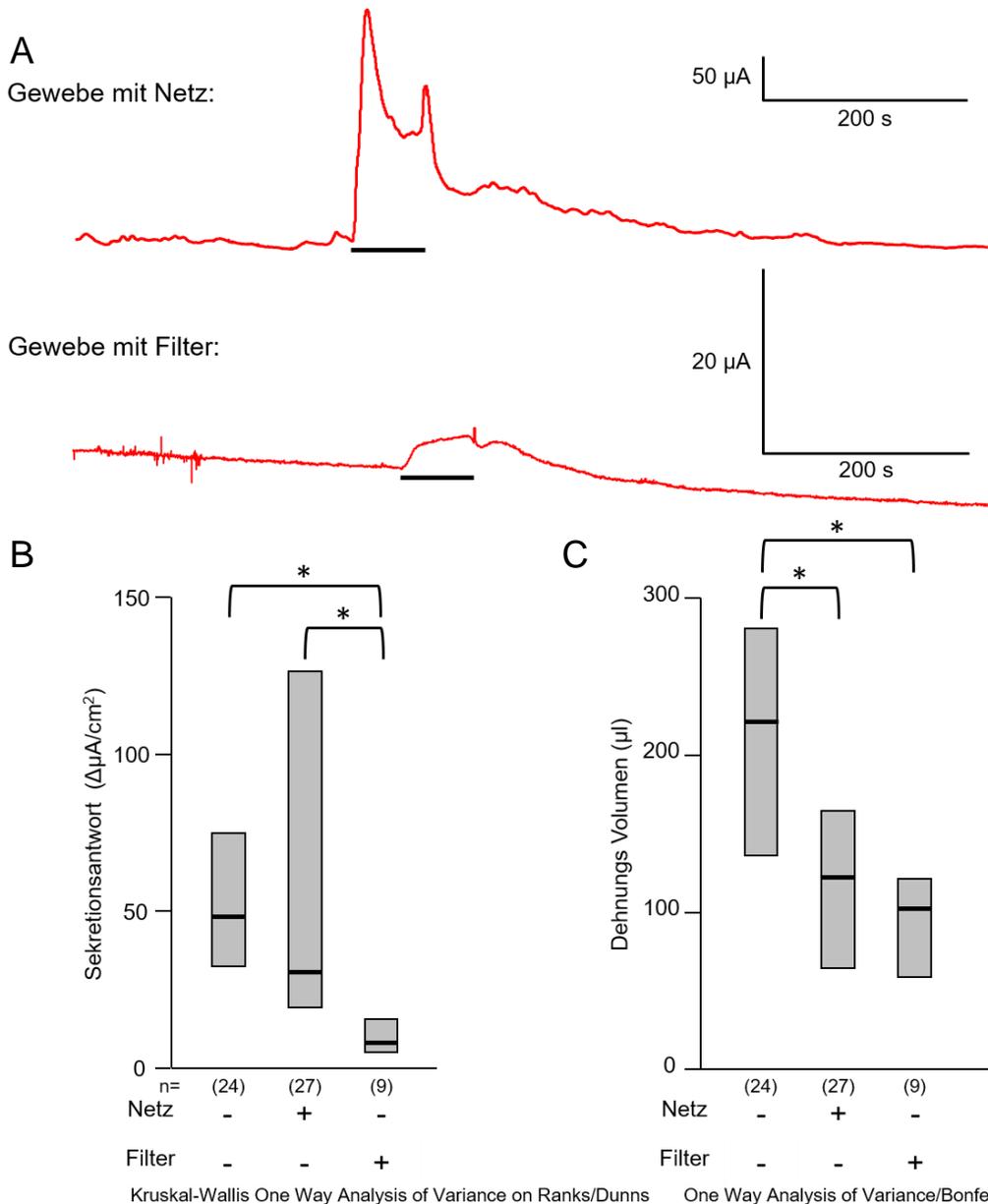


Abb. 20: Die serosal mit 20 mmHg Rampendruckinduzierte Sekretionsantwort ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) und Dauer der Dehnungsantwort (s) der Gewebe mit Netz oder Filter. **A:** Beispielgraphen für Gewebe mit Netz oder Filter. Die y-Achse zeigt die Sekretionsantwort in μA , die x-Achse die Dauer in Sekunden. Der Balken markiert die Druckstimulation. Es wurde mit großen Messflächen ($1,08 \text{ cm}^2$) experimentiert. **B:** Gezeigt ist die Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ für Gewebe ohne Netz oder Filter, mit Netz mit $150 \mu\text{m}$ Maschenweite und mit Filter mit $0,45 \mu\text{m}$ Porengröße. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bei Geweben mit Filter und Netz sowie Filter und Geweben ohne Netz oder Filter, wobei der Filter die Sekretionsantwort reduzierte ($p < 0,05$). **C:** Gezeigt ist das benötigte Dehnungsvolumen (μl). Das Dehnungsvolumen wird mit Netz oder Filter im Vergleich zu Geweben ohne Netz oder Filter signifikant reduziert. ($p < 0,05$).

Zudem wurde das benötigte Dehnungsvolumen für das Erreichen des eingestellten Druckes von 20 mmHg für die einzelnen Gewebe bestimmt (Abb. 20 C, Tabelle 14 und 37). Die Dehnungsvolumina reduzierten sich beim Vergleich von Geweben ohne Netz oder Filter zu Geweben mit Netz sowie Geweben ohne Netz oder Filter zu Geweben mit Filter signifikant (One Way Analysis of Variance, Post-Hoc Test (Bonferroni), $p < 0,001$).

Die Zunahme der Oberfläche durch Dehnung wurde anhand des Kalottenmodells bestimmt. Dabei nahmen bei Geweben ohne Netz oder Filter die Oberflächen bei Druckstimulation um 37,7%, bei Geweben mit Netz um 13,4% sowie bei Geweben mit Filter um 9,5 % zu. Dies zeigte zusätzlich den reduzierenden Effekt der Netze und Filter auf die Dehnung.

3.1.9. Dehnungsinduzierte Sekretion bei hoher K⁺-Ionen-Konzentration

Hat eine erhöhte K⁺-Ionen-Konzentration in der Versuchskrebslösung einen Einfluss auf die nervale Beteiligung bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort?

Mittels 100 mM KCl-haltiger Versuchskrebslösung wurde bei 20 mmHg serosaler Rampenstimulation und TTX 1 μ M diese Fragestellung bei der dehnungsinduzierten Sekretion untersucht (Abb. 21). Es wurden kleine Gewebehalter (0,5 cm²) im Versuch genutzt und es wurde die Kontrolle mit der nachfolgenden Stimulation in TTX verglichen.

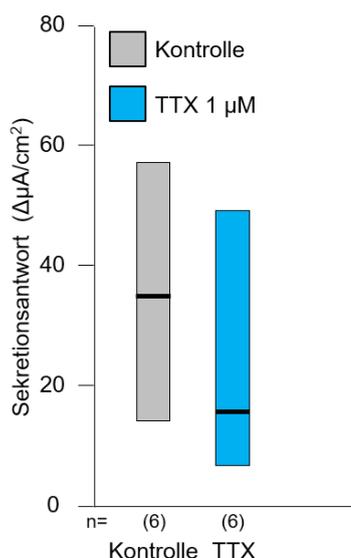


Abb. 21: 20 mmHg serosal dehnungsinduzierte Sekretionsantwort (μ A/cm²) in Versuchskrebslösung mit hohem KCl Gehalt (100 mM). Es zeigt sich keine TTX-Sensitivität bei kleinen (0,5 cm²) Messflächen.

Es zeigte sich selbst bei zu erwartender erhöhter Erregbarkeit der Nervenzellen durch erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration keine TTX-Sensitivität (Tabelle 13 und 37). Auch beim Vergleich der Stimulationsantworten in Standard Versuchskrebslösung

(siehe 3.1.7) und der hier gezeigten Versuche in 100 mM KCl-Lösung waren die Sekretionsantworten in den unterschiedlichen Lösungen nicht verschieden (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p=0,484$).

3.1.10. Welche Mediatoren vermitteln die dehnungsinduzierte Sekretion

Um den Einfluss weiterer unterschiedlicher Mediatoren auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort zu untersuchen, wurden Gadolinium (Gd^{3+}), Neostigmin und Piroxicam mit großen Messflächen sowie ω -Conotoxin mit beiden Messflächengrößen verwendet (Abb. 22, Tabelle 15 und 37). Die Gewebe wurden serosal mit 20 mmHg Rampe gedehnt und die Stimulation unmittelbar vor der Applikation des Pharmakons als Kontrolle mit der Stimulation mit Pharmakon verglichen. Zudem wurden die Wirkungen mit Netzen und im Falle von Piroxicam mit Filtern überprüft.

Mittels Gabe von Gadolinium wurde der Einfluss der mechanosensitiven Ionen-Kanäle untersucht. Die gezeigten Kurven der dehnungsinduzierten Sekretionsantworten waren Gadolinium-insensitiv (Abb. 22). Das Gewebe ohne Netz oder Filter zeigte eine biphasische Antwort, welche sich nicht durch Gadolinium veränderte (Abb. 22 A). Die Kurve mit Netz zeigte zwar ein typisches Artefakt der Kontrolle, jedoch ebenfalls keinen Effekt auf Gadolinium.

Beim Vergleich der Gewebe ohne Netz oder Filter ergab sich kein signifikanter Unterschied von Kontrolle zu Gadolinium. Beim Vergleich der Gewebe mit Netz zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in Gadolinium.

Bei der Applikation von Neostigmin sollte durch Wirkungssteigerung von ACh dessen Beteiligung an der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort überprüft werden. Die gezeigten Sekretionsantworten stiegen durch Applikation von Neostigmin an (Abb. 22). Dies wurde in 100% der Kurven beobachtet. Die Charakteristika änderten sich hierbei nicht, es zeigte sich eine biphasische Antwort. Auch in der Kurve des Gewebes mit Netz ergab sich eine Erhöhung in 91% der Gewebe in Neostigmin. Die biphasische Antwort blieb in 71% der Gewebe in Neostigmin erhalten.

Beim Vergleich der Kontrolle der Gewebe ohne Netz oder Filter gegen Neostigmin zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Antwort (Paired t-test, $p<0,001$), ebenso beim Vergleich der Gewebe mit Netz (Paired t-test, $p<0,001$).

Durch die Gabe von Piroxicam sollte die Beteiligung von Prostaglandinen an der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort überprüft werden. Die Kurven von Kontrolle

und Piroxicam bei Geweben ohne Netz oder Filter zeigten eine deutlich reduzierte Antwort in Piroxicam (Abb. 22). Zudem ergab sich im gezeigten Gewebe in Piroxicam eine monophasische Antwort, wobei in 50% der weiteren Gewebe der Doppelpeak erhalten blieb. Auch die Netz- und Filterversuche ergaben diese Reduktion in Piroxicam. Bei der Kurve des Gewebes mit eingebautem Filter war eine monophasische Antwort zu sehen, sowohl vor als auch in Piroxicam, was für die meisten Versuche mit Filter typisch war.

Beim Vergleich der Kontrolle gegen Piroxicam-Applikation zeigten sich bei den Geweben ohne Netz oder Filter (Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,031$) den Geweben mit Netzen (Paired t-test, $p=0,004$) und den Geweben mit Filtern (Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,004$) eine signifikante Reduktion der dehnungsinduzierten Antwort in Piroxicam.

Durch die Applikation von ω -Conotoxin GVIA sollte die Bedeutung der synaptischen Übertragung für die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort mittels spannungsabhängigem N-Typ Calciumkanal überprüft werden. Die Kurven der Kontrolle und in ω -Conotoxin zeigten eine Erhöhung der Antwort im Pharmakon (Abb. 22). Es ergaben sich in 33% der Gewebe starke Zunahmen der Sekretionsantwort in ω -Conotoxin. 67% der Kurven zeigte eine biphasische Antwort, die in Conotoxin weiterbestand.

Beim Vergleich der Kontrolle gegen die ω -Conotoxin-Applikation zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Basierend auf diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die separate Betrachtung der großen Messflächen einen Unterschied für die ω -Conotoxin-Sensitivität bedeuten könnte. Die Betrachtung der großen Messflächen ergab Mediane von 47,5 (26,0/116,2) der Kontrolle sowie 102,7 (29,4/218,8) in ω -Conotoxin, welche ebenfalls nicht signifikant voneinander verschieden waren ($n=4$; Paired t-test, $p=0,381$). Somit bestätigte sich wiederum der Befund der Tests in 3.1.3., da die Messflächengröße weiterhin keine Unterschiede erbrachte.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Prostaglandine und ACh an der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort beteiligt sind. Gadolinium-sensitive Mechano-sensoren scheinen nicht aktiviert zu werden. Der fehlende Einfluss von ω -Conotoxin schließt ebenfalls die Aktivierung der Synapsen aus, was mit der TTX-Insensitivität nach 20 mmHg Druckapplikation übereinstimmt. Die mucosal platzierten Netze und Filter, welche die Dehnung einschränkten, hatten keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der oben genannten Substanzen.

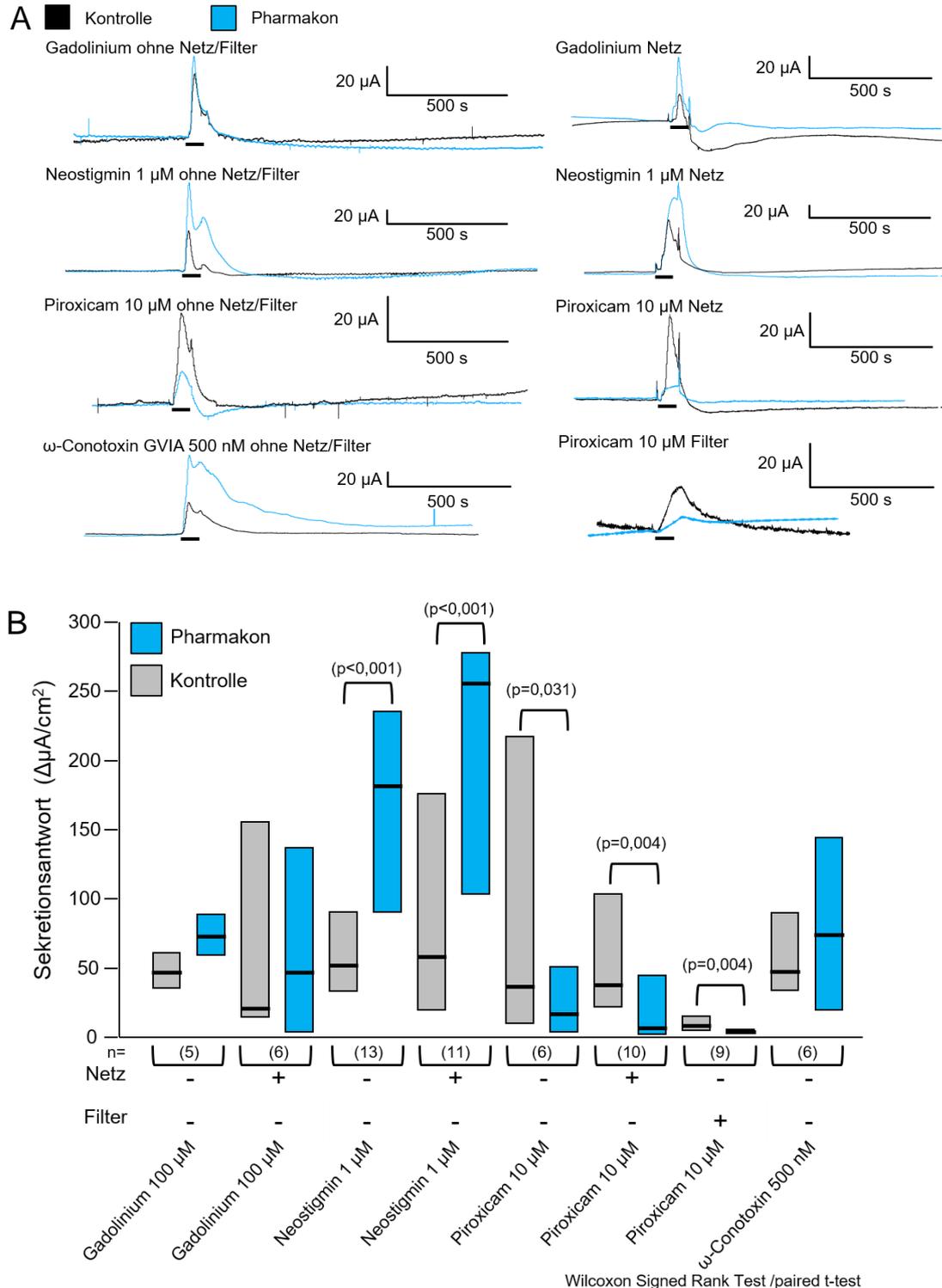


Abb. 22: Vergleiche der dehnungsinduzierten Sekretion in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei unterschiedlichen Pharmaka. A: Beispielgraphen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in μA (y-Achse) pro Dauer (in s auf der x-Achse) der jeweiligen Kontrollen und Pharmaka welche auch in B gezeigt sind. Die Druckapplikation ist mit einem Balken markiert. Es wurde mit 20 mmHg Rampe serosal stimuliert. Es wurden große Kammern ($1,08 \text{ cm}^2$) in allen Gruppen verwendet, außer bei Conotoxin (4x groß, 2x klein $0,5 \text{ cm}^2$). B: Der Einsatz von Gadolinium $100 \mu\text{M}$ gegenüber der Kontrolle war weder bei Geweben ohne Netz und Filter noch mit Netz signifikant verschieden. Der Einsatz von $1 \mu\text{M}$ Neostigmin bei Geweben ohne Netz und Filter und auch Netz hingegen erhöhte die Antwort signifikant ($p<0,05$). Die Applikation von Piroxicam $10 \mu\text{M}$ reduzierte die Sekretionsantwort bei Geweben ohne Netz und Filter, Geweben mit Netz und Geweben mit Filter signifikant ($p<0,05$). Der Einsatz von ω -Conotoxin GVIA 500 nM ergab keinen signifikanten Einfluss auf die Dehnungsantwort.

3.2. Experimente mit Humangewebe

Für alle humanen Dickdarm-Experimente wurden ausschließlich große Messflächen (1,08 cm²) genutzt. Bei zusätzlichen Ileum-Versuchen wurden große und kleine (0,5 cm²) Messflächen gemischt verwendet.

3.2.1. Abhängigkeit der Sekretionsantwort von Druck

Um zu klären, ob verschieden starke Drücke auch verschieden starke dehnungsinduzierte Sekretionsantworten hervorrufen, wurden aus den kombinierten Regionen Colon ascendens (Asc.), Colon transversum (Trans.) und Colon sigmoideum (Sig.) aufsteigende Drücke von 2-60 mmHg im Bezug auf die Sekretionsantwort (μA/cm²) untersucht. Zudem wurde in diesen Versuchen das benötigte Dehnungsvolumen (μl) für die jeweiligen Drücke bestimmt und verglichen (Abb. 23, Tabelle 16 und 38).

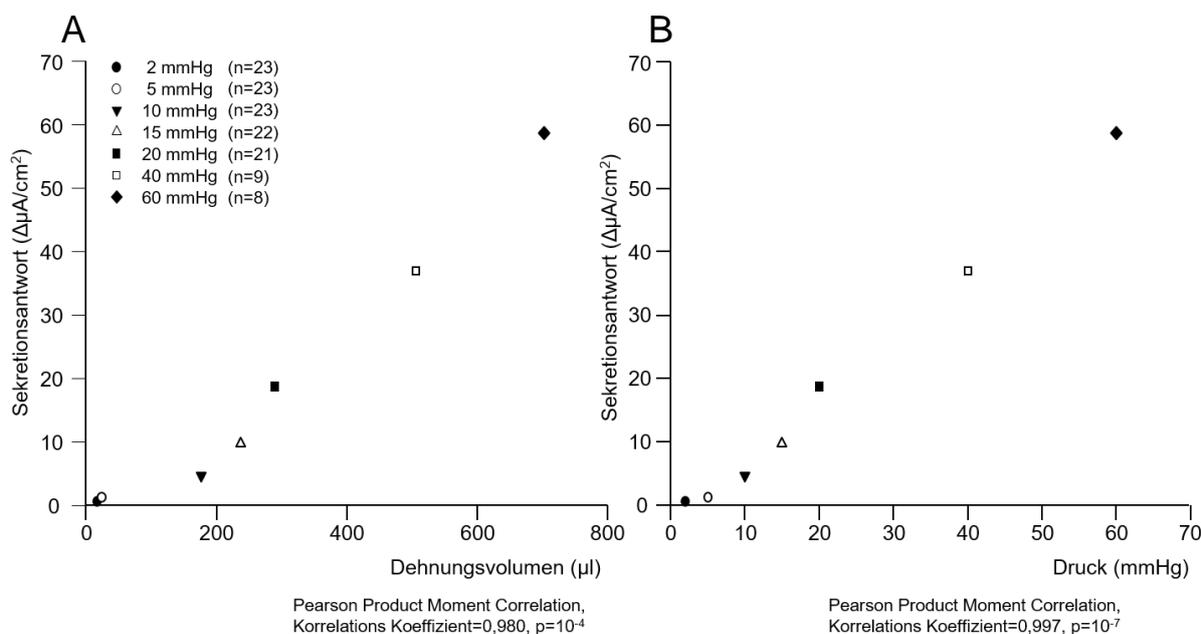


Abb. 23: Korrelation der Mediane der Sekretionsantworten (μA/cm²) welche mit aufsteigenden Rampendrücken von 2-60 mmHg in gemischten Regionen des Dickdarmes induziert wurden. A: Abgebildet sind die Mediane der Sekretionsantwort (μA/cm²) der jeweiligen mmHg Stimulation in Bezug zum benötigten Dehnungsvolumen in μl. Diese korrelieren positiv miteinander (p<0,05). B: Abgebildet sind die Sekretionsantworten in μA/cm² im Bezug zum eingestellten Druck in mmHg. Diese korrelieren positiv miteinander (p<0,05).

Der Vergleich der einzelnen Gewebe in μA/cm² gegen die mmHg Werte ergab eine signifikante, positive Korrelation (Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelationskoeffizient 0,704; p=1,348 x 10⁻²⁰). Der Vergleich der Sekretionsantwort in μA/cm² gegen die μl Werte ergab ebenfalls eine signifikante, positive Korrelation (Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelationskoeffizient 0,659; p=2,043 x 10⁻¹⁷).

Wurden aus den einzelnen Geweben Mediane je mmHg Druckstufe gebildet und miteinander korreliert, ergaben sich bei $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ gegen das Dehnungsvolumen in μl sowie bei μl gegen mmHg ebenfalls positiv korrelierende Ergebnisse (Abb. 23).

Somit lässt sich sagen, dass mit steigendem Druck und damit vermittelter stärkerer Dehnung höhere dehnungsinduzierte Sekretionsantworten erzielt wurden. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich als Druckparameter die bereits genannten 20 mmHg als Standarddruck für die folgenden Versuche. Zum einen lag dieser Wert in einem Bereich der in vivo gemessenen Drücke im Darm des Menschen (Pervez et al., 2020). Zum anderen lässt sich aus den Ergebnissen dieses Versuches ein zuverlässiges Antwortverhalten erschließen. Da eine 20 mmHg Druckapplikation keine maximale Sekretionsantwort auslöste, ermöglichte dies die Messung von sowohl Hemmung als auch Potenzierung der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort.

3.2.2. Reproduzierbarkeit bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in Humangewebe

Durch die Erkenntnisse der Korrelation von Druck und dehnungsinduzierter Sekretionsantwort ergab sich die Frage nach der Reproduzierbarkeit des beim Menschen mittleren physiologischen Druckes von 20 mmHg bei den verschiedenen Regionen des Humancolons.

In Colon-Präparaten aus fünf Dickdarmregionen wurden die Antworten nach repetitiver serosaler Rampendruckstimulation verglichen (Abb. 24). In allen Regionen waren die dehnungssensitiven Sekretionsantworten nach dreimaliger Dehnung im Abstand von 20-30 min vergleichbar (Abb. 24 A, Tabelle 17 und 38).

Ebenso wurde getestet, ob sich Unterschiede in Bezug auf das benötigte Dehnungsvolumen feststellen lassen (Abb. 24 B). Analog zu den Befunden zur unveränderten Sekretionsantwort ergaben sich auch für die zur Erreichung der 20 mmHg notwendigen Volumina keine Unterschiede (Tabelle 17 und 38). Die Compliance der Gewebe hat sich also im Verlauf dreier konsekutiver Druckapplikationen nicht geändert. Die Compliance war jedoch zwischen den Regionen unterschiedlich.

Die Reproduzierbarkeit der Sekretionsantwort sowie die Stabilität der Gewebecompliance ist für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen bedeutend, da Agonisten bzw. Antagonisten somit gepaart getestet werden konnten.

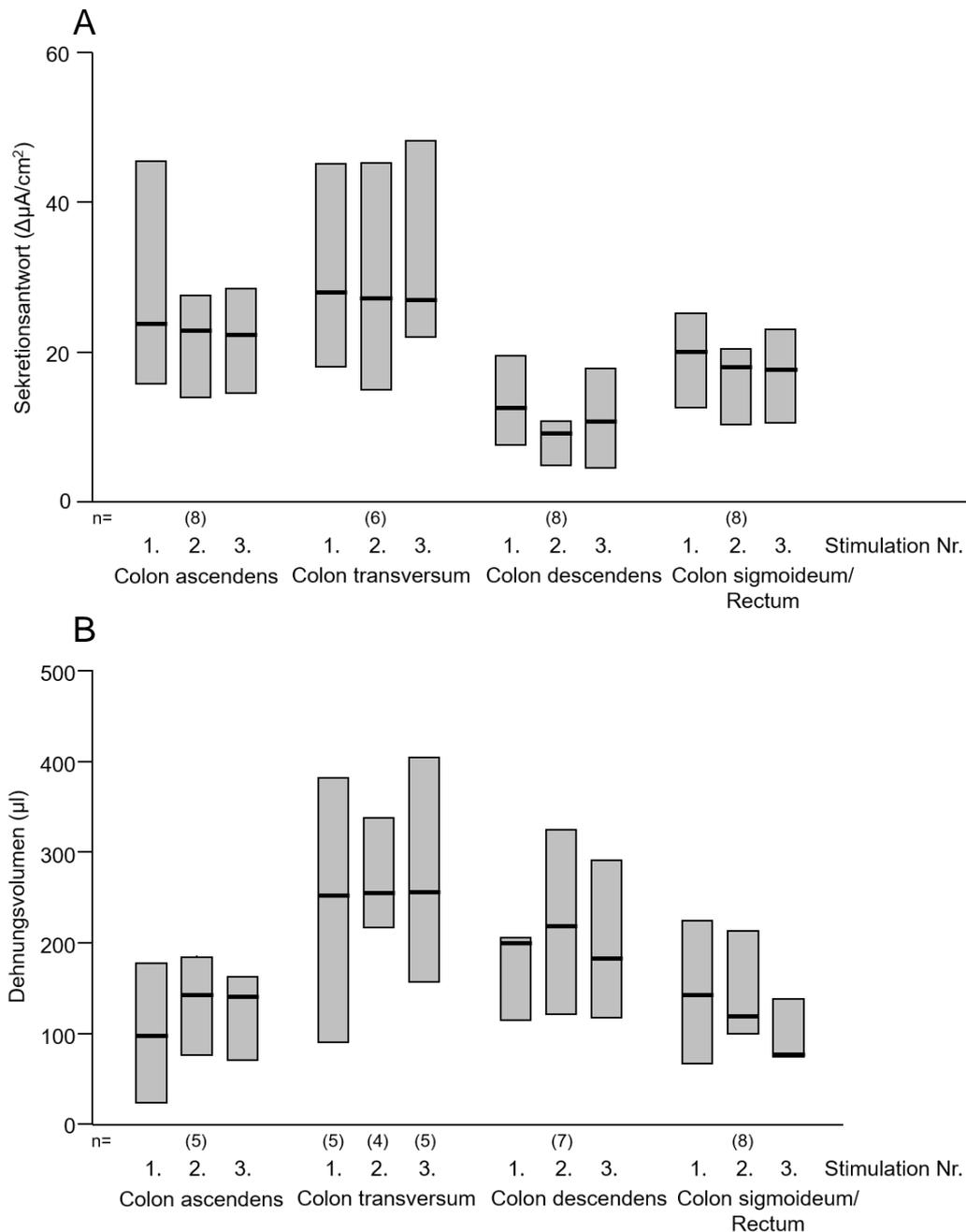


Abb. 24: Vergleiche der dreifach repetitiven 20 mmHg serosalen Druckstimulation je Region im Dickdarm des Menschen. Die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$); (A) und das Dehnungsvolumen (μl); (B) zeigten keine signifikanten Unterschiede von der ersten bis dritten Stimulation.

3.2.3. Vergleich der schnellen und langsamen Druckapplikation

Um zu klären, ob bei der dehnungsinduzierten Sekretion nicht nur die Druckhöhe sondern auch die Geschwindigkeit, mit welcher der Druck aufgebaut wird, entscheidend ist, wurden gemischte Regionen (Asc. und Sig.) des Dickdarmes des Menschen untersucht. Dabei wurden dieselben Parameter wie bei den vorangegangenen Meerschweinchengewebe verwendet, bei welchen sich Unterschiede ergeben hatten. Dabei wurden die 20 mmHg schnell (500 μ l/s) über 5 s oder langsam (50 μ l/s) über 60 s Dauer appliziert (Abb. 25).

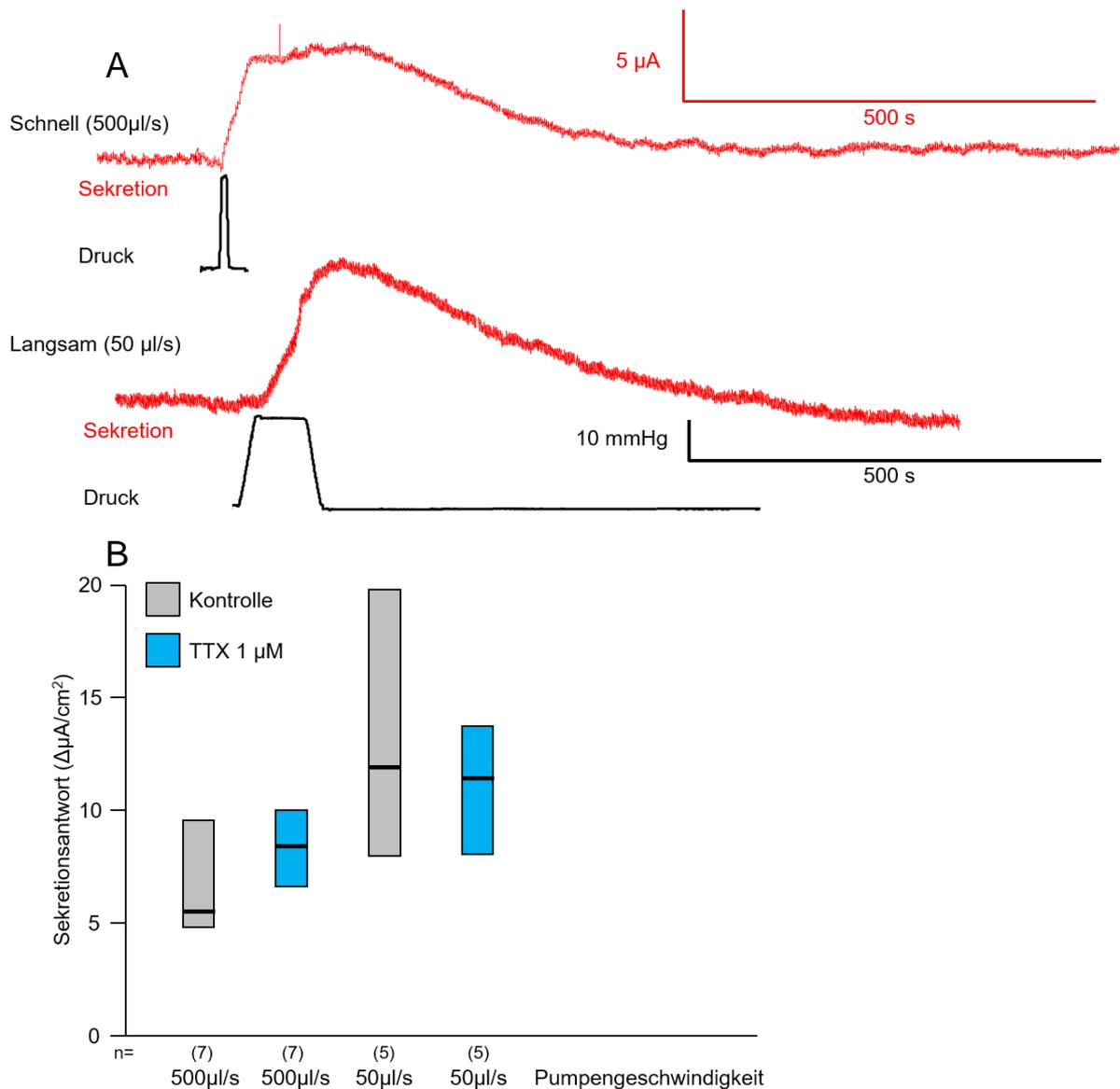


Abb. 25: Vergleiche der serosal mit 20 mmHg dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei schneller (500 μ l/s) sowie langsamer (50 μ l/s) Druckapplikation in gemischten Regionen. **A:** Beispielgraphen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (μ A, y-Achse) zweier Gewebe pro Zeit (Sekunden, x-Achse) bei schneller und langsamer Druckapplikation (in rot). Die Druckapplikation ist als schwarze Kurve in mmHg pro s dargestellt. **B:** Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen schneller und langsamer Druckapplikation sowie keine TTX-Sensitivität.

Die Kurve der schnellen Druckapplikation zeigte einen steilen Anstieg. Das Maximum wurde erst nach Stimulationsende erreicht, wobei sich eine monophasische Antwort zeigte (Abb. 25 A). Im direkten Vergleich zur langsamen Kurve wurde eine ähnlich starke Antwort mit einem vergleichbaren Kurvenverlauf detektiert.

Der Vergleich der Kontrollen untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen schneller oder langsamer Druckapplikation (Abb. 25 B, Tabelle 19 und 38). Auch zeigte sich weder bei schneller noch bei langsamer Stimulation eine TTX-Sensitivität.

Somit ergab sich in den Humanproben kein Einfluss der Geschwindigkeit der Druckapplikation auf die dehnungsinduzierte Sekretion.

3.2.4. Serosale und mucosale Druckapplikation im Vergleich

Zunächst ergab sich die Frage, ob sich die Antwort auf serosale bzw. mucosale Druckapplikationen unterscheiden und ob regionen-spezifische Unterschiede existieren.

Die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort des Beispielgewebes beginnt sowohl bei serosaler als auch bei mucosaler Stimulation unmittelbar nach dem Start des Druckstimulus (Abb. 26 A). Das Maximum wurde in beiden Fällen erst nach Beendigung der Druckstimulation erreicht. Der Anstieg der Sekretion ist, wie auch das Maximum, bei serosaler Stimulation höher als bei der mucosalen Stimulation. Das Ende der Sekretionsantwort wurde bei der mucosalen Kurve nach 10 min, bei der serosalen nach 12 min erreicht. Im Gegensatz zu der Mehrzahl der Sekretionsantworten im Meerschweinchencolon, zeigten mehr als 88% der Humangewebe lediglich monophasische Antworten.

Im Regionenvergleich lag das Trans. bei serosaler Stimulation am höchsten (Abb. 26 B, Tabelle 20 und 38). Prozentual lag die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort des Asc. um 35,8 % niedriger, das Colon sigmoideum/Rectum (Rect.) um 58,0 % niedriger und das Colon descendens (Desc.) sogar um 65,0 % niedriger als das Trans. Bei den Vergleichen der serosalen Stimulationen je Region ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen Trans. und Desc., Trans. und Sig./Rect., Trans. und Asc., Asc. und Desc. sowie zwischen Asc. und Sig./Rect. (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Dunn's), $p < 0,001$). Zusammenfassend sind alle Regionen voneinander serosal verschieden, mit Ausnahme von Sig./Rect. und Desc.

Bei den Vergleichen der mucosalen Stimulationen je Region ergeben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede der Sekretionsantworten.

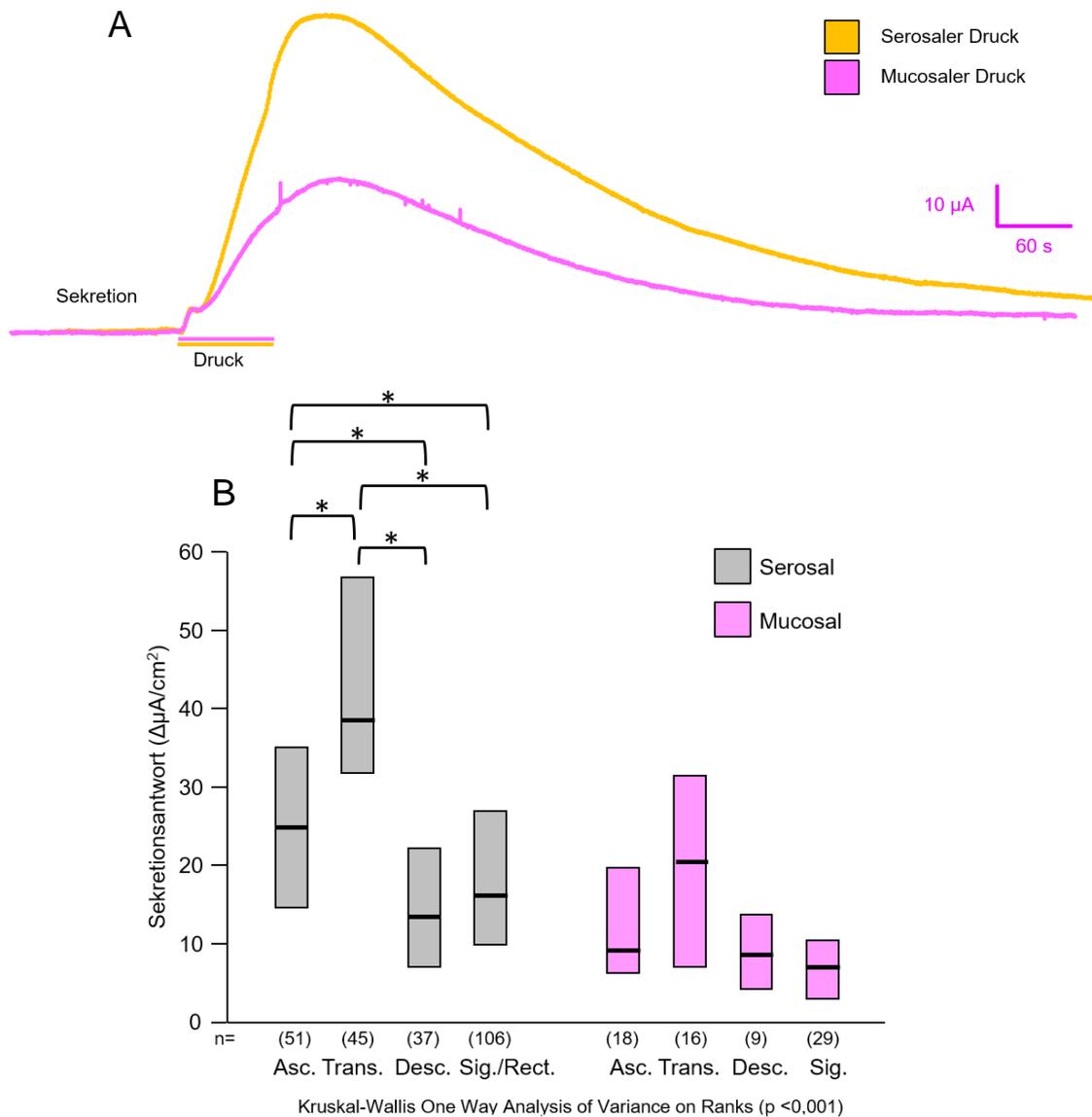


Abb. 26: Vergleich der 20 mmHg serosal und mucosal rampenstimulierten Gewebe je Dickdarm-Region. A: Beispielgraph der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (μA , y-Achse) eines serosal und mucosal mit 20 mmHg stimulierten Gewebes pro Zeit (Minuten, x-Achse). Die jeweilige Druckapplikation ist als Balken in der jeweiligen Farbe der Stimulation dargestellt. In Pink und Gelb ist die jeweilige Sekretionsantwort zu sehen. B: Vergleiche der jeweils ersten dehnungsinduzierten Sekretion ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) der serosalen und mucosalen Stimulation je Region. Bei der serosalen Stimulation sind Colon ascendens (Asc.) und Colon transversum (Trans), Trans. und Colon descendens (Desc.), Trans. und Colon sigmoideum/Rectum (Sig./Rect.), Asc und Desc. sowie Asc. und Sig/Rect voneinander signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Zudem wurden dehnungsinduzierte Sekretionsantworten der serosalen gegen die mucosale Stimulation verglichen (Abb. 27). Bei den Geweben von Asc. (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,001$), Trans. (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,001$) und Sig./Rect. (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,001$) ergeben sich signifikant niedrigere Antworten von mucosal zu serosal. Lediglich bei Desc.-Geweben gab es knapp keinen signifikanten Unterschied, was eventuell an der relativ geringen Anzahl

von Geweben mit mucosaler Stimulation oder auch bei serosaler Druckapplikation geringen Antwort lag (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p=0,060$). Im Desc. lagen ebenfalls die niedrigsten Sekretionsantworten auf den Dehnungsstimulus vor.

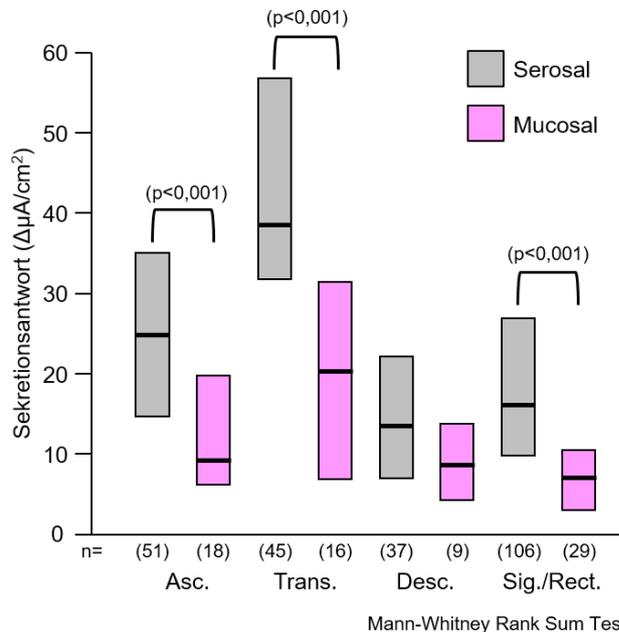


Abb. 27: Vergleich der dehnungsinduzierten Sekretionsantworten ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) der serosalen gegen die mucosalen Druckstimulationen von 20 mmHg-Rampe je Region. Es zeigten sich signifikant niedrigere Antworten bei mucosaler Stimulation im Colon ascendens, Colon transversum und Colon sigmoideum/Rectum gegenüber der serosalen Stimulation ($p < 0,05$).

Die regionenspezifischen Unterschiede der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort sowie die Abhängigkeit von mucosaler oder serosaler Druckapplikation wirft die Frage auf, ob es Unterschiede in der Dauer der Antwort oder dem Dehnungsvolumen gab.

Zudem wurde die Dauer der Sekretionsantworten je Region für die serosale und mucosale Stimulation verglichen, wobei im Falle der serosalen Stimulation das Trans. die höchste Dauer aufwies (Abb. 28, Tabelle 22 und 38). Das Desc. war um 39,9% niedriger als das Trans. sowie die Sig./Rect. Region, welche um 30,0% niedriger als das Trans. war. Das Asc. lag lediglich 20,9% niedriger als das Trans.

Interessanterweise korrelierte die Stärke der Sekretionsantworten nicht mit dem Dehnungsvolumen (Abb. 29, Tabelle 21 und 38). Dies würde bedeuten, dass die regionenabhängige Sekretionsantwort nach Dehnung nicht mit unterschiedlicher Gewebeelastizität zu erklären ist. Da zum Erreichen des Drucks von 20 mmHg vergleichbare Volumina benötigt wurden, kann man davon ausgehen, dass die Dehnung der Gewebe, sprich die Ausbeulung, ebenfalls vergleichbar waren. Nur im Desc. war das Dehnungsvolumen, welches nötig war um nach mucosaler

Druckapplikation 20 mmHg zu erreichen, signifikant geringer als das nach serosaler Druckapplikation.

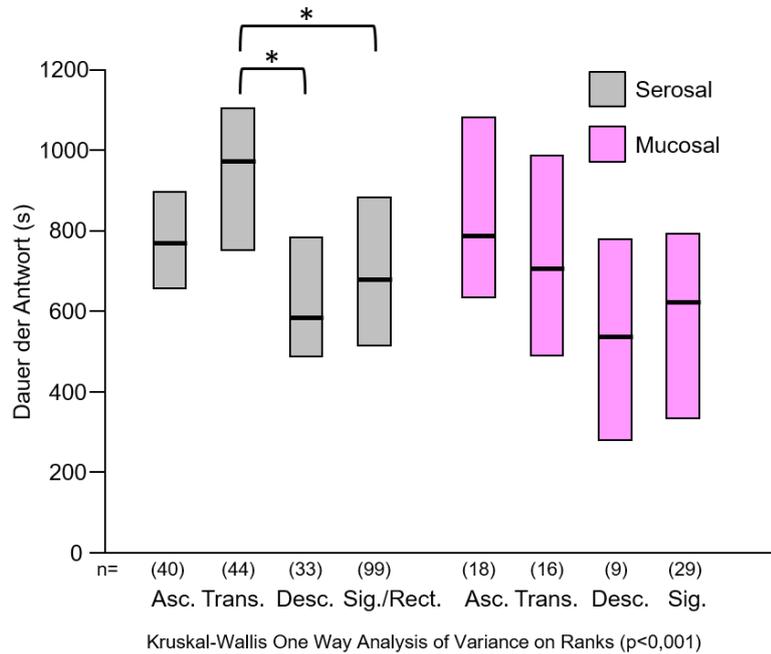


Abb. 28: Vergleiche der Dauer (s) der mit 20 mmHg-Rampe dehnungsstimulierten Gewebe bei serosalen und mucosalen Stimulationen je Region. Es zeigten sich Unterschiede der serosalen Stimulation von Colon transversum und Colon descendes sowie Colon transversum und Colon sigmoideum/Rectum ($p < 0,05$). Bei den mucosalen Stimulationen ergaben sich keine regionalen Unterschiede.

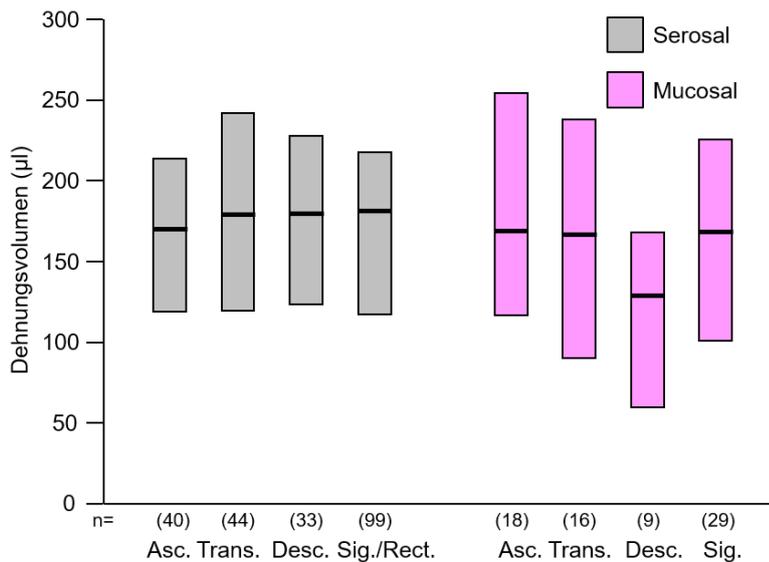


Abb. 29: Vergleiche des benötigten Dehnungsvolumens (µl) der mit 20 mmHg-Rampe dehnungsstimulierten Gewebe bei serosalen und mucosalen Stimulationen je Region. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Im Vergleich der serosal stimulierten Regionen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Trans. und Desc. sowie Trans. und Sig./Rect. (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Dunn's), $p < 0,001$). Bei den mucosal stimulierten Regionen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Regionen (One Way Analysis of Variance, $p = 0,083$).

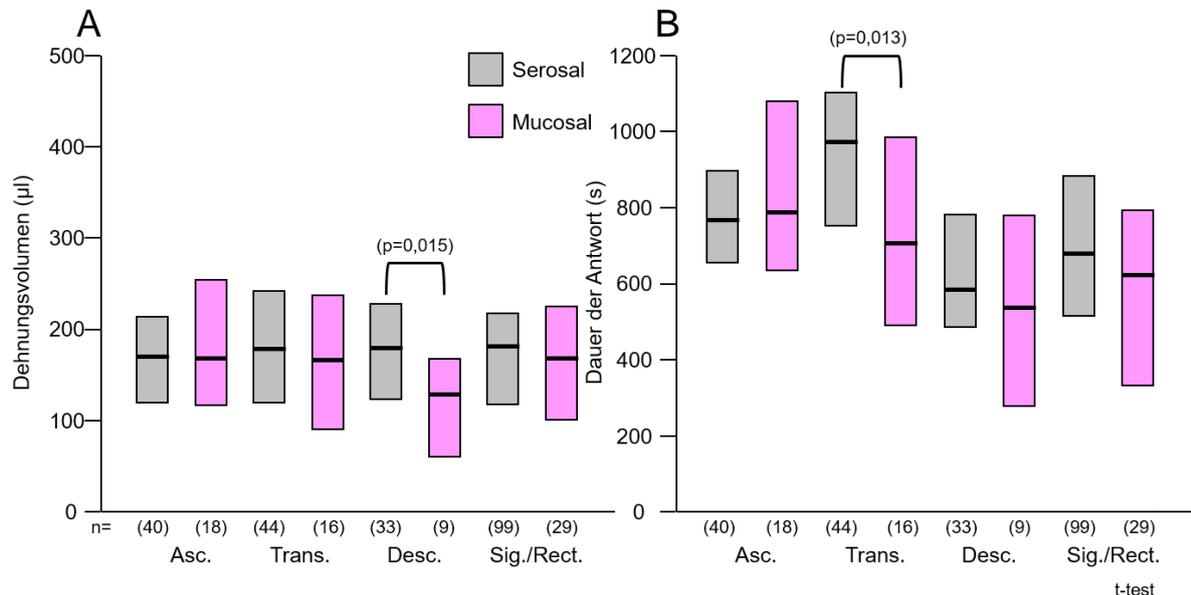


Abb. 30: Vergleiche der serosalen und mucosalen Stimulation mit 20 mmHg Rampendruck. Die verwendeten Gewebe sind identisch zu Abb. 26-27. A: Vergleiche der Dehnungsvolumina (μl) bei serosaler gegen mucosale Stimulation zeigten nur im Colon descendens eine mucosal signifikant niedrigere Dehnung ($p < 0,05$). B: Vergleiche der Dauer der Sekretionsantwort (s) der serosalen gegen die mucosale Stimulation ergaben nur im Colon transversum eine signifikante Reduktion gegenüber mucosal ($p < 0,05$).

Zudem wurden die Parameter für die Dauer (Abb. 30 A) und das Dehnungsvolumen (Abb. 30 B) für serosale und mucosale Dehnungsstimulationen auch gegeneinander getestet.

Beim Vergleich der serosalen gegen die mucosalen Stimulationen je Region ergab sich für die Dehnungsvolumina eine signifikante Reduktion von serosal zu mucosal im Desc. (t-test, $p = 0,015$). Dabei handelte es sich um eine Abnahme von 28,3%. Im Asc., im Trans. sowie im Sig./Rect. zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dehnungsvolumina der serosalen und mucosalen Stimulation.

Beim Vergleich der serosalen gegen die mucosalen Stimulationen je Region ergab sich für die Dauer der Sekretionsantworten eine signifikante Reduktion von serosal zu mucosal im Trans. (t-test, $p = 0,013$). Hierbei lag die mucosale Dauer 27,4% niedriger als die serosale. Im Asc., im Desc. sowie im Sig./Rect. zeigten sich keine signifikanten

Unterschiede zwischen den Dehnungsvolumina der serosalen und mucosalen Stimulation.

Zusammenfassend ergaben sich in fast allen Regionen bei serosaler Stimulation Unterschiede. Zudem lagen in fast allen Regionen niedrigere mucosale Stimulationsantworten vor als bei serosaler. Die Dauer unterschied sich serosal in den Regionen Trans. zu Desc. und Trans. zu Sig./Rect. und es ergab sich im Desc. eine niedrigere mucosale Dehnung als bei serosaler Stimulation. Die Dauer war im Trans. bei mucosaler Stimulation niedriger als bei serosaler Stimulation.

3.2.5. TTX-Sensitivität bei serosaler und mucosaler Stimulation

Wie bereits bei den Versuchen mit Meerschweinchengewebe erwähnt, ergaben bisherige Untersuchungen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in Meerschweinchen und Ratte eine nervale Beteiligung (Diener und Rummel, 1990; Frieling et al., 1992).

Daher wurde die TTX-Sensitivität der dehnungsinduzierten Sekretion auch mit Humangewebe untersucht. Dazu wurden serosale und mucosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg gepaart im selben Gewebe vor und nach TTX-Inkubation verglichen.

Die obere der beiden Kurven zeigt eine serosale Stimulationsantwort (Abb. 31 A). Die Höhe der dehnungsinduzierten Sekretion änderte sich auch bei einer Inkubation mit TTX nicht. Dies zeigte sich bei 72% der Gewebe. Die mucosale Stimulation ergab eine niedrigere Antwort als die serosale. Das Maximum der Sekretionsantwort in TTX liegt im gezeigten Fall mucosal niedriger als das der Kontrolle.

Bei der Gesamtheit der serosalen Stimulation je Region ergab die prozentuale Abnahme zwischen Kontrolle und TTX im Asc. 26,4%, im Trans. 1,7%, im Desc. 17,1% und im Sig./Rect. 6,7% (Abb. 31 B, Tabelle 23 und 38). Bei einem Vergleich der Kontrollen gegen TTX zeigte sich bei serosaler Stimulation eine signifikante Reduktion der Sekretionsantwort im Asc. (Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,025$), jedoch nicht im Trans., Desc. oder Sig./Rect.

Bei einem Vergleich der Kontrollen gegen TTX zeigte sich bei der mucosalen Stimulation hingegen in keiner Region eine TTX-Sensitivität und somit keine nerval

vermittelte Komponente der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (Abb. 31 C, Tabelle 24 und 38).

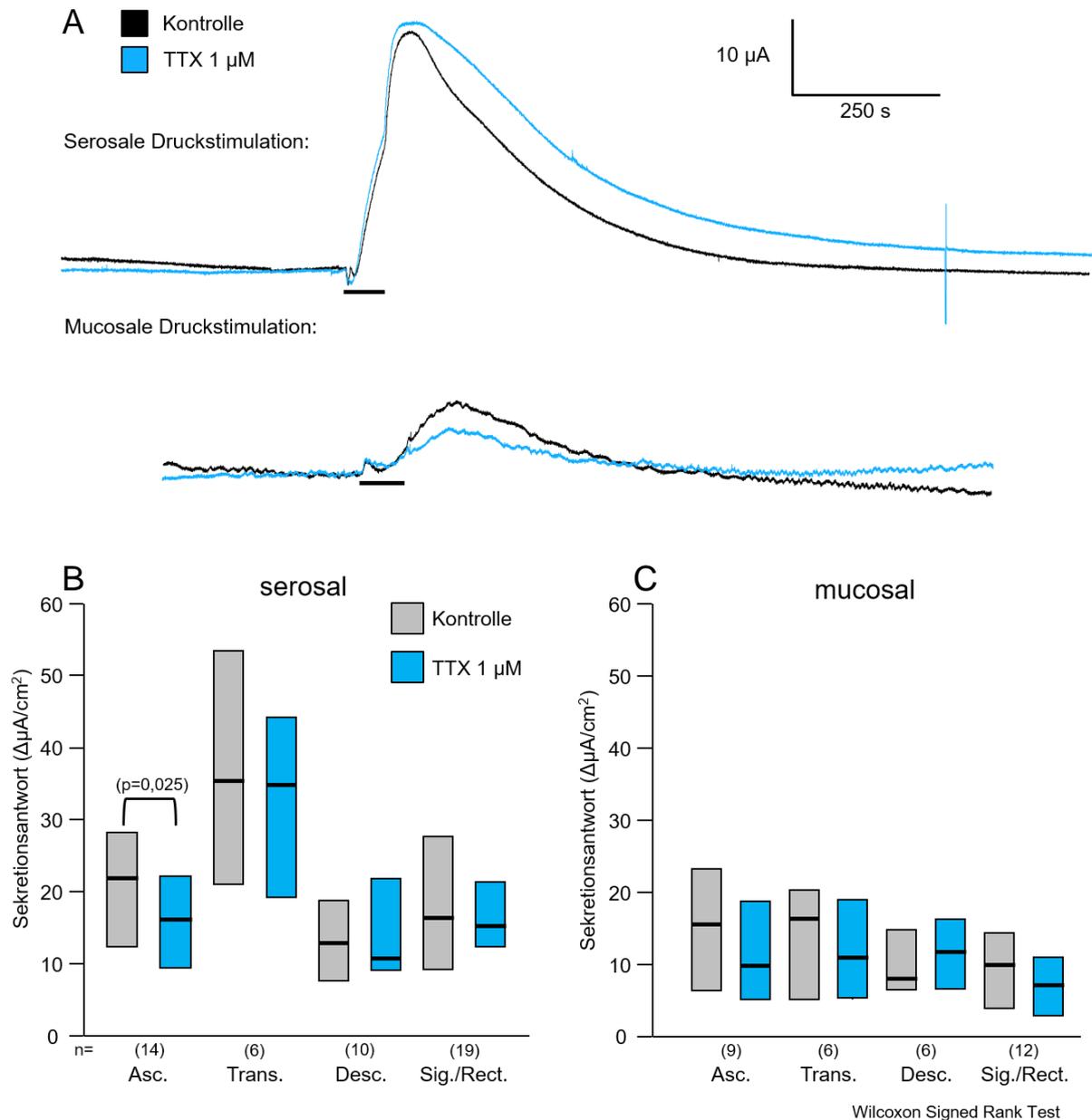


Abb. 31: Vergleiche der 20 mmHg-Rampen dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei serosaler und mucosaler Stimulation. A: Beispielgraphen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in μ A (y-Achse) pro Dauer (in Sekunden auf der x-Achse) der jeweiligen Kontrollen und in TTX 1 μ M. Die Druckapplikation ist als Balken unter der Kurve gezeigt. B: Vergleiche der serosalen Stimulation der Kontrolle und bei TTX-Applikation je Region. Hier zeigte nur das Colon ascendens eine TTX-Sensitivität ($p < 0,05$). C: Vergleiche der mucosalen Stimulation der Kontrolle und bei TTX-Applikation je Region. Es ergab sich keine TTX-Sensitivität bei mucosaler Stimulation.

3.2.6. Vergleiche der serosal und mucosal gepulsten Stimulation

Um herauszufinden, ob ein 60 s lang andauernder Rampenstimulus dieselben dehnungsinduzierten Sekretionsantworten wie mehrere kurze gepulste Stimuli auslöst, wurden weitere Versuche durchgeführt. Angelehnt an das Kontraktionsmuster des Dickdarmes wurden für die gepulsten Stimulationen je zehn Einzelpulse von je 5 s Dauer serosal und mucosal appliziert und verglichen (Gayer und Basson, 2009).

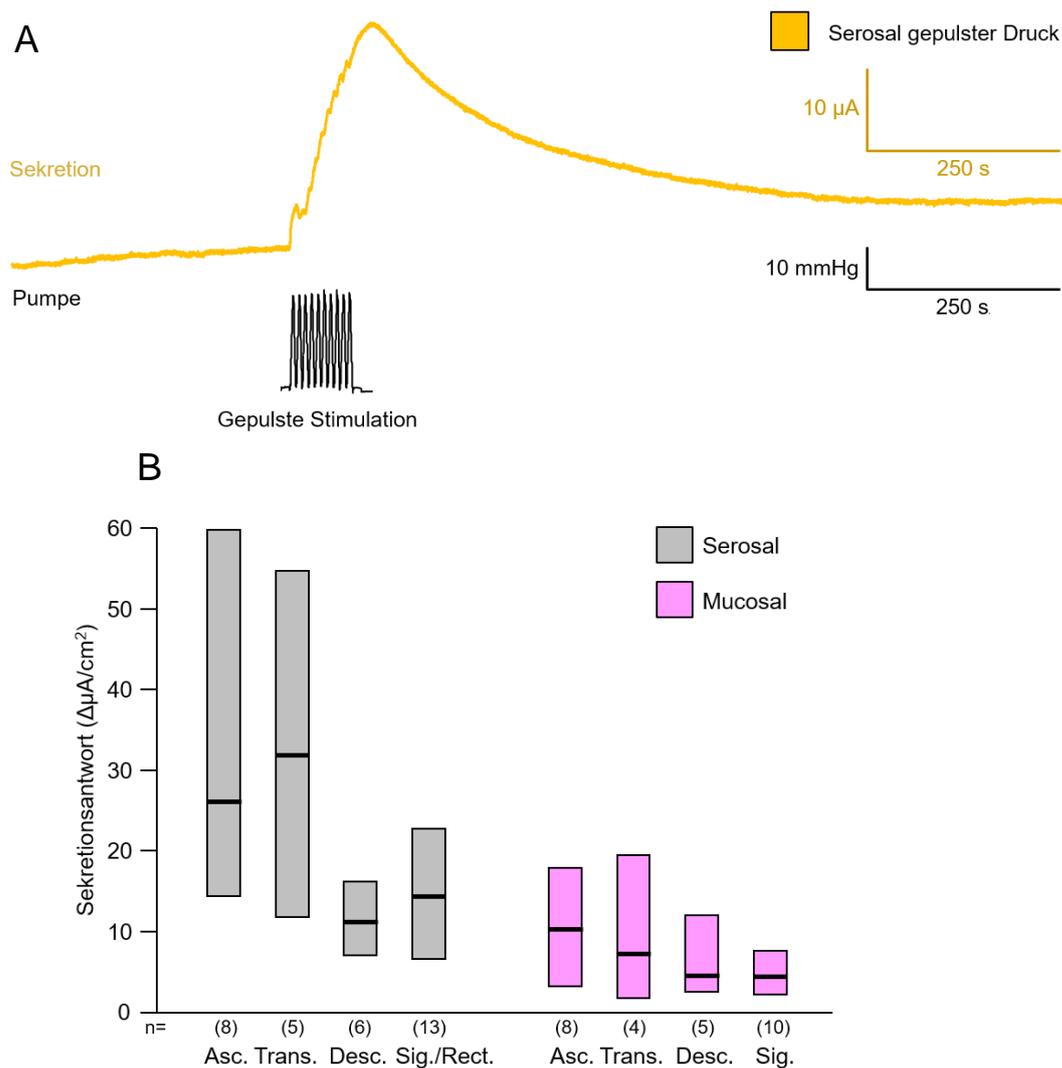


Abb. 32: Vergleiche der 20 mmHg dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei serosal und mucosal gepulster Stimulation. A: Kurve der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (μA , y-Achse) eines serosal gepulsten mit 20 mmHg stimulierten Gewebes pro Zeit (Minuten, x-Achse). In schwarz ist die Druckapplikation (mmHg, y-Achse) gezeigt. In Gelb ist die Sekretionsantwort zu sehen. B: Es zeigten sich keine regionalen Unterschiede bei serosaler oder mucosal gepulster dehnungsinduzierter Sekretionsantwort.

Die Kurve der Sekretionsantwort des Beispielgewebes zeigte auch bei der gepulsten Stimulation eine unmittelbar nach Stimulationsbeginn ansteigende Sekretion mit einem Maximum (Abb. 32 A). Die gepulste Druckapplikation verursachte durch die

schnellen Start- und Stopp-Bewegungen der Pumpe wellenartige Artefakte in der Kurve. Diese beeinträchtigten die Messung nicht. Die ansteigende dehnungsinduzierte Sekretionsantwort zeigte, dass zehn Einzelpulse aufsummiert werden und als Druckimpuls eine Sekretionsantwort auslösen.

Im Regionenvergleich der serosalen Stimulationen wie auch bei den mucosalen Stimulationen ergaben sich keine signifikanten, regionalen Unterschiede (Abb. 32 B, Tabelle 25 und 38).

Zudem wurden auch bei der gepulsten Stimulation die jeweils serosalen und mucosalen Stimulationen miteinander verglichen (Abb. 33).

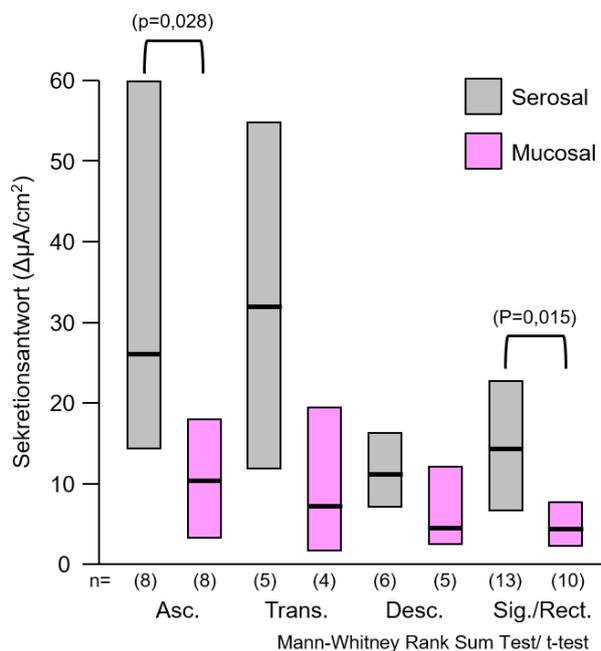


Abb. 33: Vergleich der dehnungsinduzierten Sekretionsantworten in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ der serosal und mucosal gepulsten Stimulationen. Bei 20 mmHg Druck gegeneinander zeigten sich signifikant niedrigere Werte der mucosalen Stimulation im Colon ascendens und Colon sigmoideum-/Rectum ($p < 0,05$).

Hierbei ergaben sich je Region signifikante Reduktionen der Antwort im Asc. (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p=0,028$) sowie im Sig./Rect. (t-test, $p=0,015$). Im Trans. und im Desc. ergaben sich keine Unterschiede von serosal gegenüber mucosal.

Es wurden Vergleiche der serosalen und mucosalen Rampenstimulationsversuche aus 3.2.4 mit denen der hier gezeigten serosal und mucosal gepulsten Stimationsversuche durchgeführt. Es ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Testergebnisse je Region bei einem Vergleich mittels Mann-Whitney Rank Sum Test von serosaler Rampenstimulation gegen serosal gepulst. Auch die mucosalen Stimulationen waren bei Rampen- gegen Pulsstimulation nicht signifikant verschieden.

3.2.7. TTX-Sensitivität bei serosal und mucosal gepulster Stimulation

Um zu überprüfen, ob es sich bei der serosal und mucosal gepulsten dehnungsinduzierten Sekretion um eine TTX-sensitive Antwort handelt, wurde auch bei den gepulsten Gewebestimulationen die Sekretion unmittelbar vor TTX und nach TTX-Gabe verglichen. Dabei wurden auch die serosalen und mucosalen Stimulationen gegen Stimulationen in TTX gegenübergestellt (Abb. 34).

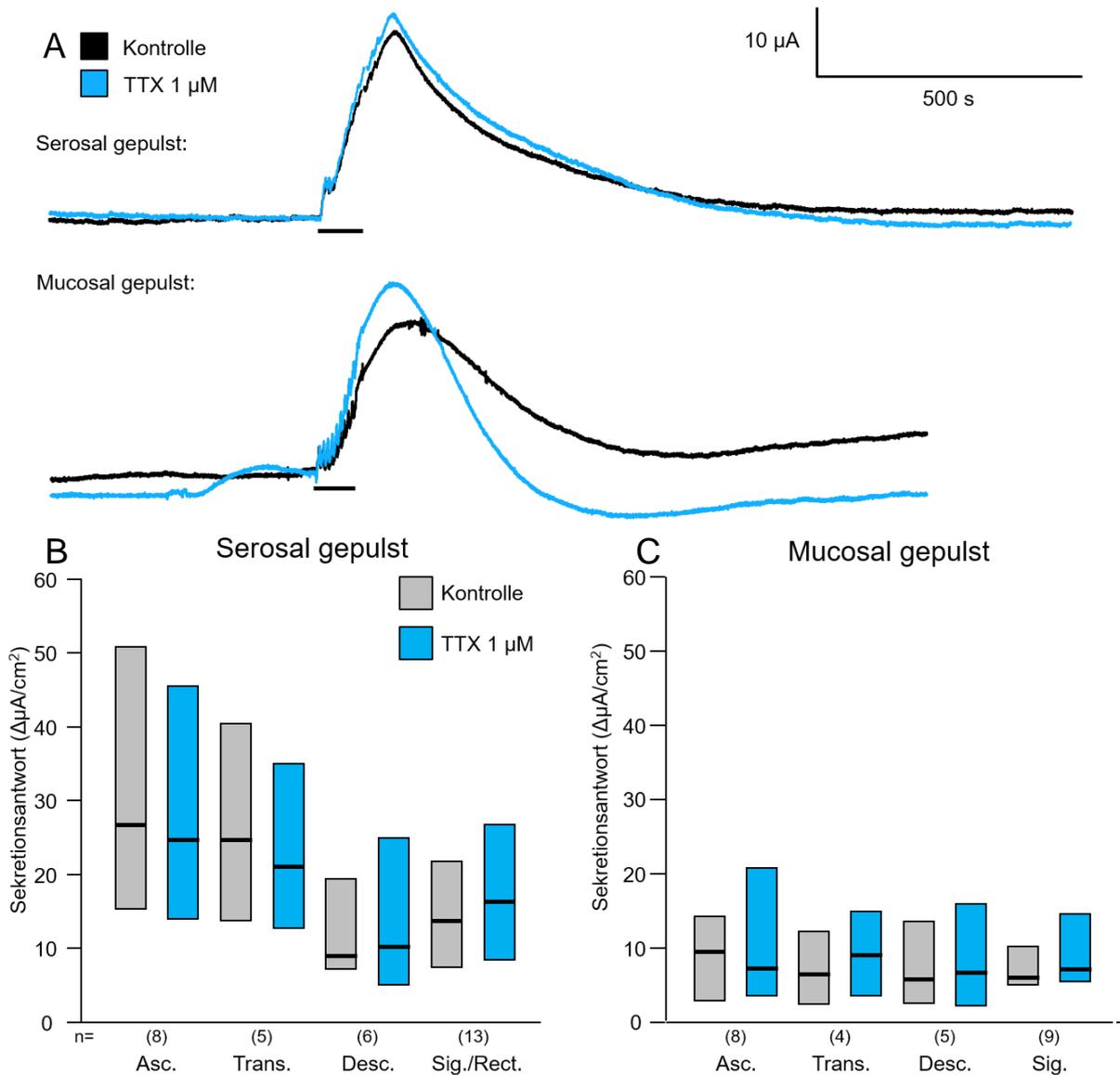


Abb. 34: Vergleiche der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort der 20 mmHg serosal wie auch mucosal gepulst stimulierten Gewebe je Region. **A:** Beispielgraph der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (μA , y-Achse) zweier Gewebe, jeweils serosal und mucosal gepulst stimuliert mit 20 mmHg Druck pro Zeit (s, x-Achse). Der Balken stellt hierbei die Druckstimulation dar. Es wurden 10 Pulse mit je 5 Sekunden Dauer appliziert. **B:** Die serosal dehnungsinduzierte Sekretionsantwort zeigte keine TTX-Sensitivität. **C:** Die mucosal dehnungsinduzierte Sekretionsantwort zeigte ebenfalls keine TTX-Sensitivität.

Die Kurve des Beispielgewebes der serosal gepulsten Stimulation weist von Kontrolle zu TTX keine Unterschiede der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort auf (Abb. 34 A). Die Kurve der mucosalen Stimulation zeigte bei der Kontrolle eine leicht ansteigende Basislinie. Zudem war das Maximum der Kontrolle etwas niedriger als das der TTX Stimulation, was sich bei 65% aller untersuchten Gewebe zeigte.

Bei den Vergleichen der serosal gepulsten Stimulationen der Kontrollen gegen die Stimulation in TTX ergab sich keine TTX-Sensitivität (Abb. 34 B, Tabelle 26 und 38).

TTX hatte ebenfalls keinen Effekt auf die mucosal gepulste dehnungsinduzierte Sekretionsantwort (Abb. 34 C, Tabelle 27 und 38).

3.2.8. Die Rollen von Chlorid und Bikarbonat

Im Humancolon sind die Chlorid- und Bikarbonat-Ionen für die elektrisch vermittelte Sekretionsantwort verantwortlich (Krueger et al., 2016). Basierend auf den Ergebnissen am Tiermodell bei der dehnungsinduzierten Sekretion stellte sich daher die Frage, ob auch im Menschen die dehnungsinduzierte Sekretion durch Chlorid vermittelt wird, Bikarbonat jedoch wie beim Meerschweinchen keine Rolle zu spielen scheint (Frieling et al., 1992). Um dies zu untersuchen, wurde je ein Gewebe dreifach mit 20 mmHg Rampe serosal stimuliert. Die erste Stimulation erfolgte in Standard-Versuchskrebslösung, die zweite Stimulation in Cl⁻-freier oder Cl⁻/HCO₃⁻-freier Lösung (Siehe Tabellen 6 und 7) sowie einer dritten Stimulation wiederum in Standard-Versuchskrebslösung nach dem Auswaschen der anionenarmen Lösung.

Diese drei aufeinander folgenden Stimulationen zeigten als Besonderheit eine starke Reduktion des Maximums bei der zweiten Stimulation in der jeweiligen anionenarmen Lösung, wie hier in Beispielgeweben gezeigt (Abb. 35 A). Nach dem Auswaschen und der Rückkehr zur Standardlösung erholte sich die Antwort wieder, erreichte aber nicht exakt die Ausgangswerte. In Cl⁻/HCO₃⁻-freier Lösung lag das Maximum niedriger als in Cl⁻-freier Lösung (Reduktion um 87,4% in Cl⁻-freier sowie um 94,7% in Cl⁻/HCO₃⁻-freier Lösung).

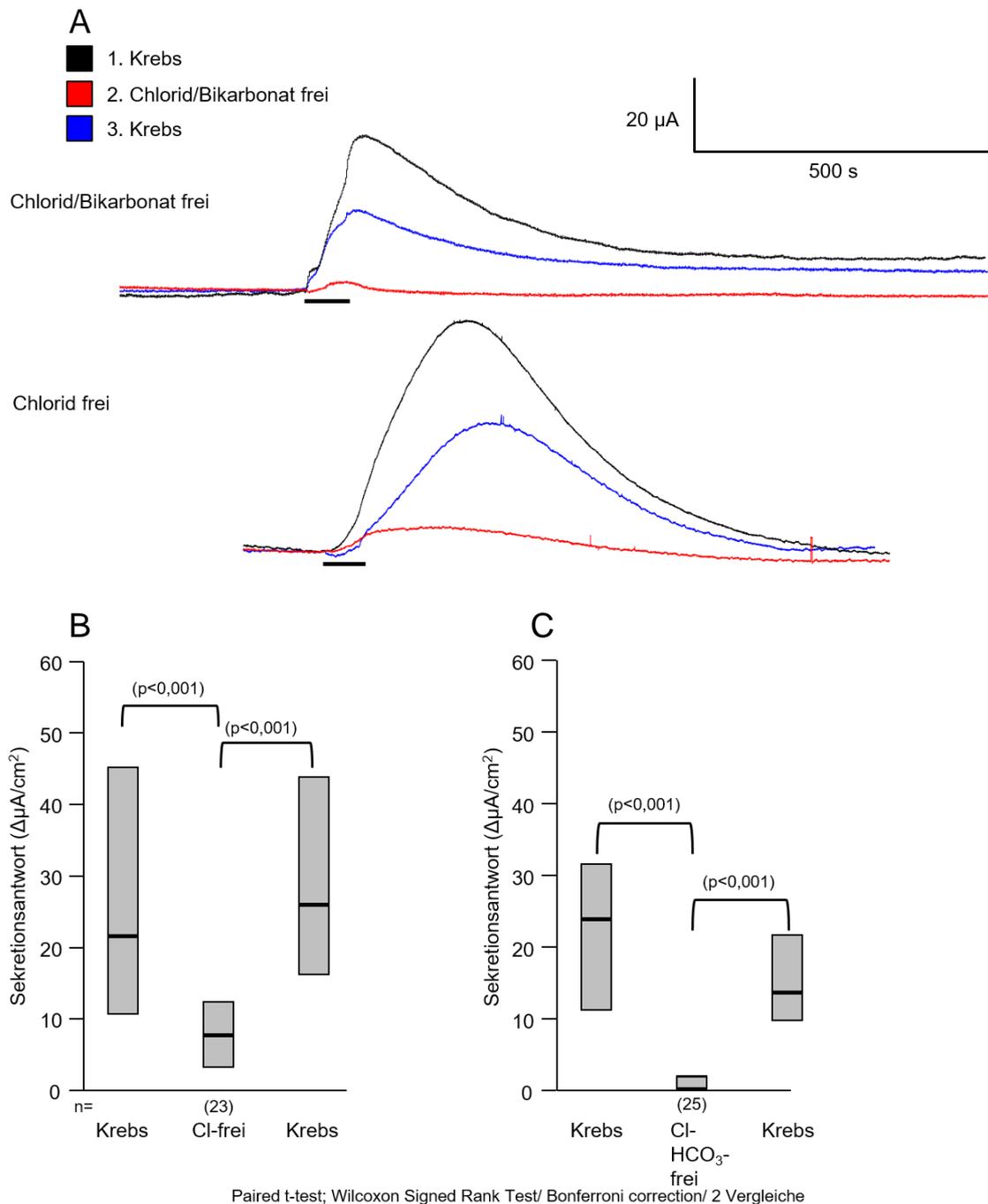


Abb. 35: Vergleiche von Sekretionsantworten in Standard Versuchskrebslösung zu Chlorid (Cl⁻)-freier oder Chlorid/Bikarbonat (Cl⁻/HCO₃⁻)-freier Versuchslösung und anschließendem Washout in Standard-Versuchskrebslösung für gemischte Regionen. A: Beispielgraph der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (μ A, y-Achse) zweier Gewebe pro Zeit (s, x-Achse), wobei der Balken die Druckstimulation darstellt. Die Stimulationen zeigen die Sekretionsantwort in Standard-Krebslösung und Cl⁻-freier oder Cl⁻/HCO₃⁻-freier Lösung. Stimuliert wurde mit 20 mmHg Rampendruck. B: Die Sekretionsantwort in Cl⁻-freier Versuchslösung ist verglichen mit der Standard-Versuchskrebslösung signifikant reduziert ($p < 0,025$). C: Die Sekretionsantwort in Cl⁻/HCO₃⁻-freier Versuchskrebslösung ist verglichen mit der Standard-Versuchskrebslösung ebenfalls signifikant reduziert ($p < 0,025$).

Die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in μ A/cm² lag bei den gezeigten Geweben bei der ersten Stimulation in Krebs bei 21,6 (10,6/45,3), in Cl⁻-freier Lösung bei 7,8 (3,2/12,5) sowie beim Washout wieder in Standard-Versuchskrebslösung bei 26,0

(16,1/44,0); (Abb. 35 B). Es wurden Gewebe aus den Regionen des Asc., Trans., Desc und Sig. verwendet (n=23); (Tabelle 28 und 38).

Die Änderungen der Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ lagen bei der Stimulation in Krebslösung bei 24,0 (11,1/31,6) in $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -freier Lösung bei 0,3 (0,0/2,0) sowie beim Washout wieder in Standardkrebslösung bei 13,7(9,7/21,8); (Abb. 35 C). Es wurden die kombinierten Regionen des Asc., Trans., Desc. und Sig. verwendet (n=25).

Bei den Vergleichen der Stimulationen mit Krebslösung gegenüber denen mit Cl^- -freier Lösung zeigten sich signifikante Reduktionen (Erste Stimulation gegen Cl^- -freie Lösung; Wilcoxon Signed Rank Test, $p<0,001$ sowie Cl^- -freie Lösung gegen Washout in Krebslösung; Paired t-test, $p<0,001$).

Bei den Vergleichen der Stimulationen in Krebslösung gegenüber denen mit $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -freier Lösung zeigten sich signifikante Reduktionen zur Ionen-reduzierten Lösung. (Erste Stimulation gegen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -freie Lösung; Wilcoxon Signed Rank Test, $p<0,001$ sowie $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -freie Lösung gegen Washout in Krebslösung; Wilcoxon Signed Rank Test, $p<0,001$).

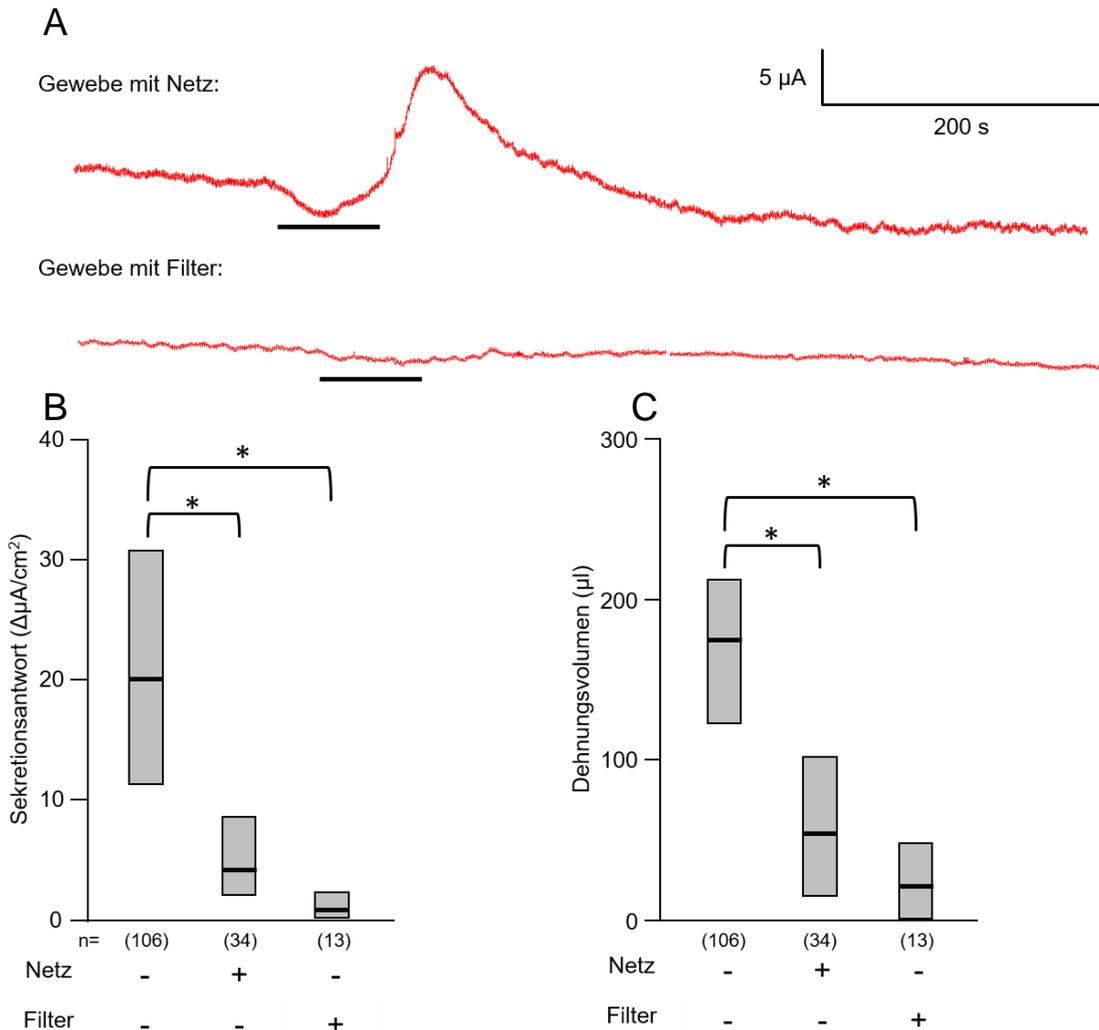
Zudem waren die Sekretionsantworten der Gewebe in $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -freier Lösung gegenüber denen in Cl^- -freier Lösung signifikant niedriger (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p<0,001$). Die Antworten in $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -freier Lösung waren von Null verschieden (One-Sample t-test, $p<0,001$).

3.2.9. Vergleiche der sekretorischen Antwort bei Dehnung und Kompression

Um zu überprüfen, ob die Dehnung oder die Kompression des Gewebes denselben sekretorischen Effekt aufweist, wurden Netze und Filter in Analogie der Meerschweinchenversuche (siehe 3.1.8) auf der Mucosa platziert und die Gewebe serosal mit 20 mmHg Rampe stimuliert.

Die Sekretionsantwort in Geweben mit eingebautem Netz wies eine unmittelbar nach Stimulationsstart ansteigende Antwort auf, mit einem Artefakt (Absinken der Kurve bei Druckapplikation), welches durch die Bewegung des Netzes entstand (Abb. 36 A). Dieses beeinträchtigte die Messung nicht. Das Maximum wird nach Stimulationsende erreicht. Die druckinduzierte Sekretionsantwort des Gewebes mit eingebautem Filter

zeigte eine sehr starke Reduktion. Beide Kurvenverläufe waren typisch bei den Stimulationsantworten bei Verwendung von Netz und Filter.



Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks ($p < 0,001$)

Abb. 36: Vergleiche der serosalen Druckapplikation von 20 mmHg Rampe bei Gewebe ohne Netz oder Filter, Gewebe mit Netz und Gewebe mit Filter auf der Mucosa-Seite. A: Kurven der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (μA , y-Achse) zweier Gewebe mit Netz und Filter bei 20 mmHg serosaler Stimulation pro Zeit (s, x-Achse). Der Balken markiert die Druckstimulation. Es zeigten sich signifikant reduzierte Sekretionsantworten ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) von den Geweben ohne Netz oder Filter gegenüber denen mit Netz und Filter (B) sowie signifikant reduzierte Dehnungsvolumina von den Geweben ohne Netz oder Filter gegenüber denen mit Netz und Filter (C); ($p < 0,05$).

Die Sekretionsantworten ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) lagen bei den Geweben ohne Netz oder Filter bei 20,1 (11,2/30,8) ($n=106$), mit Netz bei 4,2 (2,0/8,7); ($n=34$) sowie mit Filter bei 0,9 (0,0/2,4); ($n=13$); (Abb. 36 B, Tabelle 30 und 38).

Im Vergleich der Sekretionsantworten untereinander ergab sich eine signifikante Reduktion von Geweben ohne Netz oder Filter zu Geweben mit Netz sowie Geweben ohne Netz oder Filter zu Geweben mit Filter (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Dunn's), $p < 0,001$).

Das benötigte Dehnungsvolumen derselben Gewebe in μl lag bei Geweben ohne Netz oder Filter bei 175,1 (122,2/213,2), mit Netz bei 54,2 (14,6/102,3) sowie mit Filter bei 21,3 (0,0/48,8); (Abb. 36 C, Tabelle 31 und 38). Die Oberflächenveränderung der Gewebe durch Dehnung lag im Kalottenmodell bei den Geweben ohne Netz oder Filter bei 25,5%, die der Gewebe mit Netz bei 2,7% sowie der Gewebe mit Filter bei 0,3%.

Das Dehnungsvolumen nahm vom Geweben ohne Netz oder Filter zu Geweben mit Netz sowie von Geweben ohne Netz oder Filter zu Geweben mit Filtern hin signifikant ab (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Dunn's), $p < 0,001$).

Trotz der marginal erhöhten Sekretionsantwort waren die Messwerte der Gewebe mit Filter signifikant von 0 verschieden (One-Sample t-test $p = 0,004$).

3.2.10. Welche Mediatoren vermitteln die dehnungsinduzierte Sekretion

Bei gemischten Regionen des humanen Dickdarmes wurden unterschiedliche Pharmaka auf ihre Einflüsse bei der dehnungsinduzierten Sekretion getestet (Abb. 37). Die Fragestellungen waren hierbei dieselben wie bei den Meerschweinchenversuchen unter 3.1.10. Nach Gabe des jeweiligen Pharmakons (Gadolinium, Neostigmin, Piroxicam, ω -Conotoxin und zusätzlich Tropisetron) wurde nachfolgend im jeweiligen Gewebe TTX und im Falle von Neostigmin nachfolgend Atropin eingesetzt (Tabelle 33 und 38).

Alle Stimulationen erfolgten, mit Ausnahme der mit Tropisetron inkubierten Gewebe, serosal mit 20 mmHg Rampenstimulation. Im Falle von Tropisetron wurde mucosal stimuliert, um enterochromaffine Zellen vermehrt zu aktivieren und einen etwaigen 5-HT-Effekt auf die dehnungsinduzierte Sekretion zu forcieren. Die untersuchten Gewebe stammten aus dem Asc., Trans., Desc. und Sig. Im Falle der Neostigmin-Versuche (5 μM) stammen die Gewebe aus dem Asc., Trans. und Sig. Bei Neostigmin (1 μM) mit TTX und Piroxicam wurden zusätzlich zu den vier Regionen Asc., Trans., Desc., und Sig. noch Rect.-Gewebe untersucht.

Die Sekretionsantwort des Beispielgewebes mit Gadolinium zeigte eine geringe Abnahme gegenüber der Kontrolle, jedoch von Gadolinium zu TTX dann eine stärkere Reduktion (Abb. 37 A). Dieses Verhalten wiesen 52% der Gewebe in den Versuchen auf. Im Vergleich von Kontrolle und Gadolinium zeigte sich kein signifikanter

Unterschied, jedoch ergab sich beim Vergleich Gadolinium gegen TTX eine signifikante Reduktion (Abb. 37 B); (Wilcoxon Signed Rank Test, $p < 0,001$).

Die Sekretionsantwort des Beispielgewebes in Neostigmin zeigte eine Zunahme von der Kontrolle zu Neostigmin, welche in TTX wieder abnahm (Abb. 37 A). Der prosekretorische Neostigmin-Effekt zeigte sich in 63% der Gewebe in 1 μM und in 85% der Gewebe in 5 μM Konzentration von Neostigmin. In TTX ergaben die weiteren Versuche zu 72% Reduktionen der Antworten (Abb. 37 B).

Im Vergleich der Kontrolle zu Neostigmin 1 μM ergab sich eine signifikante Erhöhung (Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,016$), jedoch keine Unterschiede von Neostigmin zu TTX. Die Kontrollgewebe gegen Neostigmin 5 μM zeigten ebenfalls eine signifikante Erhöhung (Paired t-test, $p < 0,001$), jedoch keine Unterschiede von Neostigmin zu TTX. Im Falle der 5 μM Konzentration fiel in den Versuchen eine mehrheitliche Abnahme der Sekretionsantworten in TTX auf, welche durch ein einzelnes Gewebe, welches eine deutliche Erhöhung der Sekretionsantwort in TTX ergab, insgesamt nicht TTX-sensitiv war. Bei einem Test ohne dieses Gewebe ergab sich eine hohe Signifikanz von $p = 0,002$.

Zudem wurden sechs Gewebe in den Versuchen mit 1 μM Neostigmin und anschließend mit Atropin (ATR) inkubiert. Die Gewebe wiesen keinen Neostigmin-Effekt und eine geringe Abnahme der Antwort in ATR auf (Abb. 37 A). Drei der sechs Gewebe zeigten keine Sensitivität auf die beiden Pharmaka. Im Vergleich der Kontrolle zu Neostigmin bei diesen Versuchen ergab sich, anders als in den Geweben mit Neostigmin 1 μM /TTX, keine Neostigmin-Sensitivität sowie ebenfalls kein Unterschied von Neostigmin zu ATR (Abb. 37 B).

Durch Gabe von Tropisetron sollte die Beteiligung des nervalen 5-HT₃-Rezeptors an der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort überprüft werden. Die Sekretionsantwort des Beispielgewebes wurde durch Tropisetron erhöht, welche nur wenig in TTX verringert wurde (Abb. 37 A). Dieses Verhalten wiesen 57% der Gewebe auf.

Im Vergleich der Kontrolle zu Tropisetron ergab sich eine signifikante Erhöhung (Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,020$), sowie kein Unterschied von Tropisetron zu TTX (Abb. 37 B).

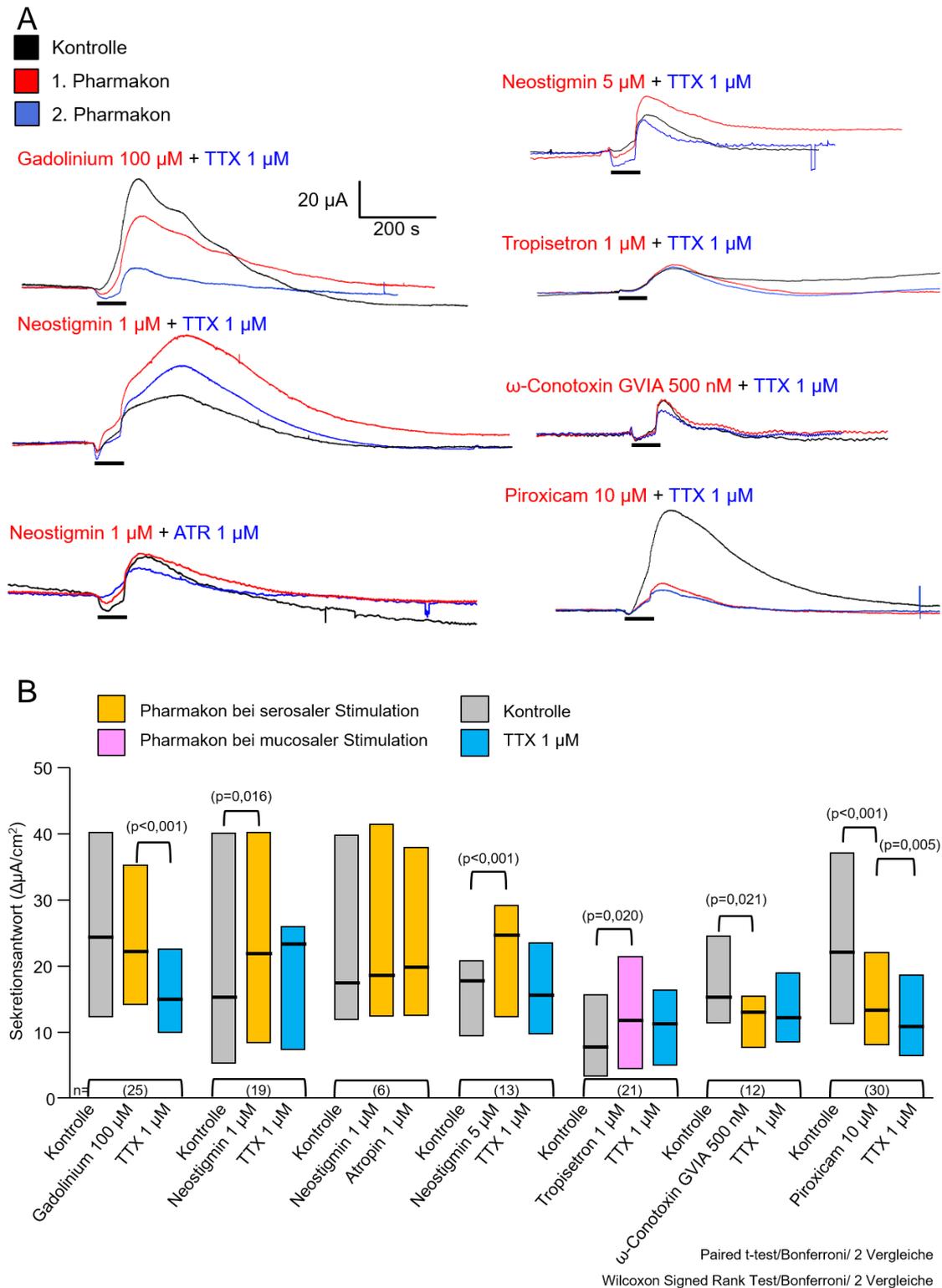


Abb. 37: Vergleiche der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei Applikation verschiedener Pharmaka in gemischten Dickdarmregionen. A: Sekretionsantworten nach Applikation der angegebenen Pharmaka. Die Balken markieren die Druckstimulation B: Es zeigten sich signifikante Erhöhungen der Sekretionsantwort beim Vergleich der Kontrollen zur ersten Pharmakologie bei Neostigmin 1 μM (n=19), bei Neostigmin 5 μM sowie bei Tropicsetron 1 μM (p<0,05). Es zeigten sich Reduktionen der Sekretionsantwort von Kontrolle zu erster Pharmakologie bei ω-Conotoxin GVIA 500 nM sowie Piroxicam 10 μM. Gadolinium 100 μM und Piroxicam zeigten eine Reduktion der Sekretionsantwort von der ersten Pharmakologie zur zusätzlichen TTX-Gabe (p<0,05).

Mit ω -Conotoxin GVIA (500 nM)-Applikation wurde die Sekretionsantwort des Beispielgewebes leicht reduziert, wobei der Peak abflachte (Abb. 37 A). Die Antwort in ω -Conotoxin wurde nicht durch TTX verändert. Dieser Verlauf zeigte sich in 67% der Gewebe. Im Vergleich aller Gewebe bei Kontrolle gegenüber ω -Conotoxin ergab sich eine signifikante Reduktion (Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,021$) sowie keine weiteren Unterschiede von ω -Conotoxin zu TTX (Abb. 37 B). In den Versuchen wurde lediglich ein Gewebe aus dem Asc. eingesetzt, was bedeutet, dass sich die ermittelte Sensitivität nicht durch einen regionenspezifischen Effekt erklären lässt. Die weiteren Gewebe stammten aus Trans., Desc. und Sig.

Die Sekretionsantwort des Beispielgewebes der Kontrolle gegenüber Piroxicam wurde deutlich reduziert (Abb. 37 A). Dies war in 77% der Gewebe der Fall. Die Antwort in Piroxicam wurde durch TTX in diesem Gewebe nicht weiter verändert. In 47% der Gewebe zeigte sich jedoch eine weitere Reduktion der Antwort. Im Vergleich aller Gewebe bei Kontrolle zu Piroxicam ergab sich eine signifikante Reduktion (Wilcoxon Signed Rank Test, $p<0,001$), sowie ebenfalls eine signifikante Abnahme von Piroxicam zu TTX (Paired t-test, $p=0,005$); (Abb. 37 B).

Insgesamt zeigten sich somit signifikante Erhöhungen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort durch Erhöhung der endogenen Acetylcholin-Konzentration sowie durch 5-HT₃ Blockade. Die Blockade der synaptischen Transmitterausschüttung sowie die Hemmung der Prostaglandinsynthese bewirkten eine Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort. Bei Gadolinium und Piroxicam zeigte sich zusätzlich eine Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei nachfolgender Gabe von TTX.

3.2.11. Prostaglandin vermittelte Sekretion

Um zu überprüfen, ob die nicht dehnungsinduzierte, aber durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) ausgelöste Sekretionsantwort neural vermittelt ist, wurden Versuche in den kombiniert dargestellten Regionen Asc., Desc. sowie Sig./Rect. durchgeführt. Hierbei wurde die PGE₂-Applikation mit der PGE₂-Applikation in TTX verglichen. Die zwei Applikationen erfolgten jeweils in einem separaten Gewebe desselben Patienten.

Die PGE₂ vermittelte Sekretionsantwort wies einen schnellen Anstieg mit einem hohen monophasischen Peak im Beispielgewebe auf (Abb. 38 A). Die Antwort war stabil ohne Anzeichen einer Desensibilisierung. Dies war bei allen Kurven der Fall. Die Antworten

mit und ohne TTX-Inkubation unterschieden sich weder in der Form noch in der Stärke der Antwort stark voneinander.

Beim Vergleich der Sekretionsantworten aller Gewebe in PGE₂ und in TTX mit PGE₂ zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 38 B, Tabelle 32 und 38). Somit war die PGE₂-Sekretionsantwort nicht neural vermittelt.

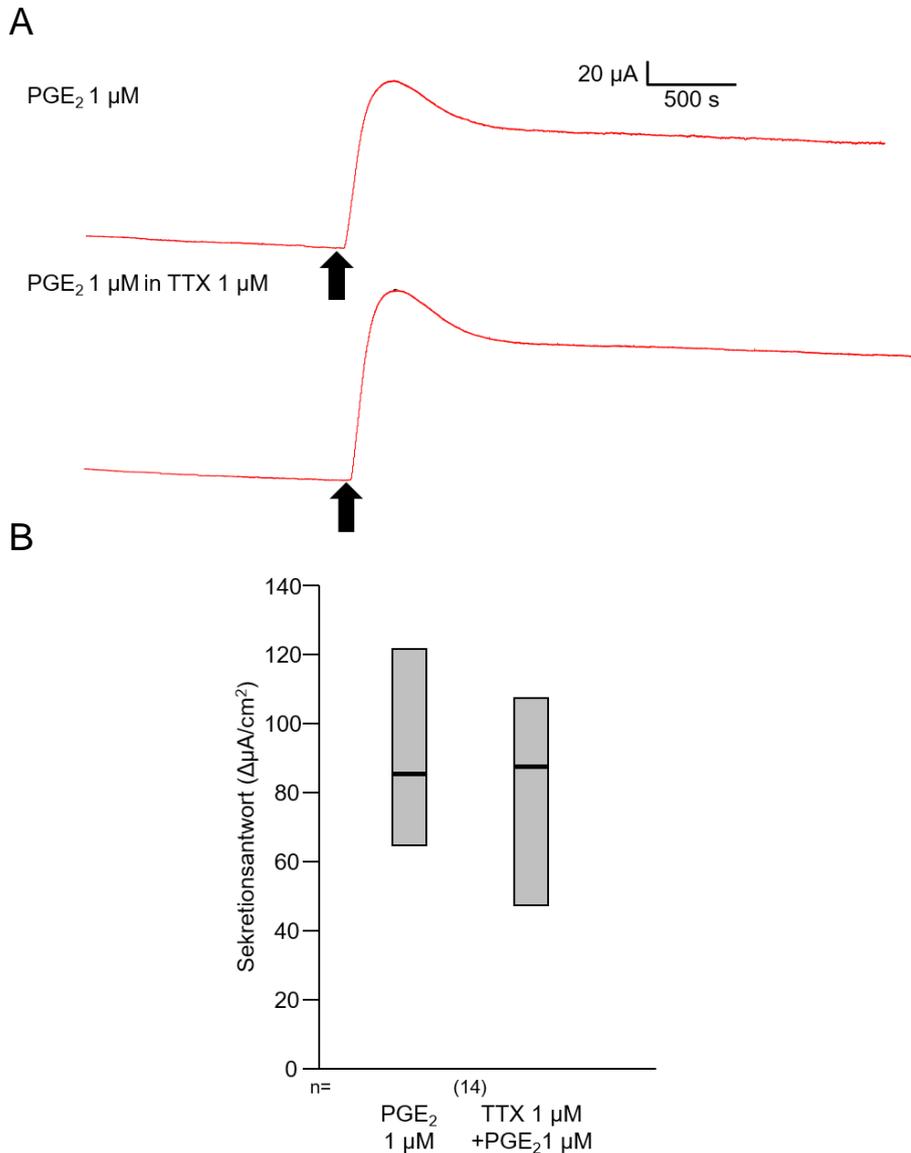


Abb. 38: Vergleiche der Prostaglandin induzierten Sekretionsantwort mit und ohne Einfluss durch TTX 1 μM. **A:** Beispielgraphen der PGE₂ vermittelten Sekretionsantwort (μA, y-Achse) je Gewebe pro Zeit (s, x-Achse). Der Zeitpunkt der Zugabe von PGE₂ ist mit einem Pfeil markiert. Im obigen Gewebe ist die Sekretionsantwort von PGE₂ ohne vorherige TTX Gabe, im unteren bei PGE₂-Applikation in TTX gezeigt. Es zeigten sich keine Sekretions-Unterschiede. **B:** Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PGE₂ und PGE₂ + TTX.

3.2.12. Einflüsse von Diagnosen, Geschlecht und Alter auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort

Haben Alter, Geschlecht und die Diagnose des Patienten Einfluss auf die Antwortstärke der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort? Zur Klärung dieser Frage wurden 115 Gewebe von 73 Patienten bei 20 mmHg serosaler Rampenstimulation in Bezug auf Alter, Widerstand zu Beginn des Experimentes sowie dehnungsinduzierte Sekretionsantworten verglichen (Abb. 39). Die Gewebe stammten aus dem Asc., Trans., Desc. und Sig./Rect. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 66,0 (56/77) Jahren.

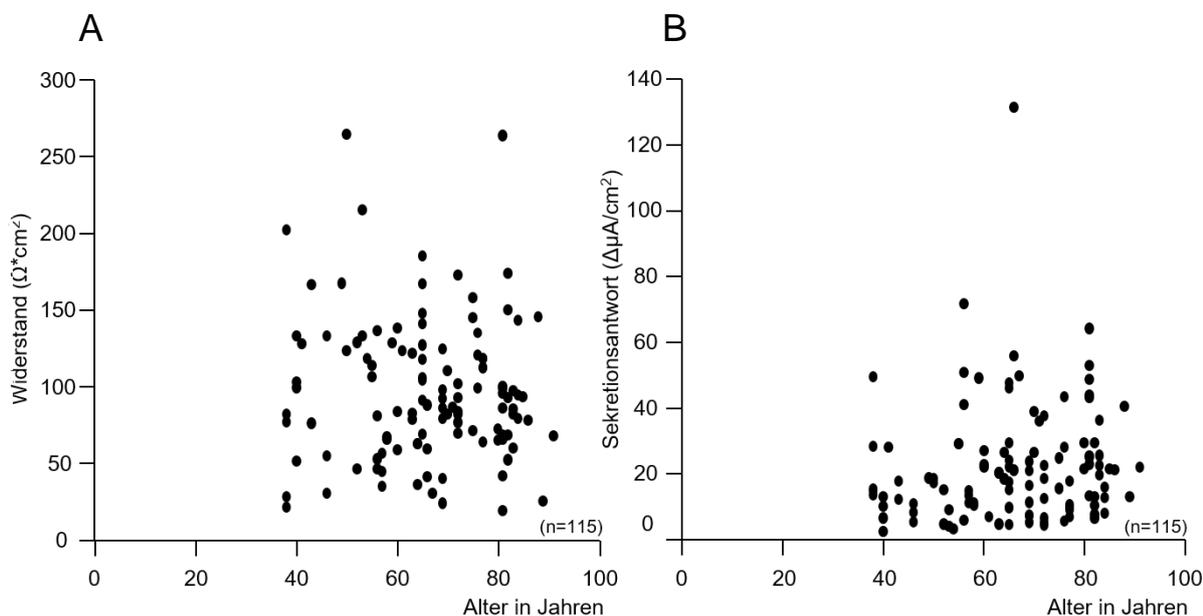


Abb. 39: Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und Gewebewiderstand ($\Omega \cdot \text{cm}^2$); (A) sowie zwischen Alter und der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$); (B). Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden. Untersucht wurden 115 Gewebe aus allen Colonregionen.

Bei einer Korrelation dieser Parameter ergaben sich weder bei Widerstand und Alter noch bei Sekretionsantwort und Alter signifikante Zusammenhänge (Tabelle 34 und 38).

Dieselben 115 Gewebe wurden zudem im Bezug auf geschlechterspezifische Unterschiede bei der dehnungsinduzierten Sekretion untersucht, wobei die 66 Gewebe von weiblichen Patienten sich nicht von denen der 49 Gewebe der männlichen Patienten unterschieden (Abb. 40 A, Tabelle 35 und 38).

Zudem wurde untersucht, ob unterschiedliche Diagnosen Einfluss auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort bei einem Stimulus von 20 mmHg serosal auf

Sig./Rect. Proben haben (Abb. 40 B). Der Vergleich der drei Diagnosen Divertikulitis, Karzinom und Colitis ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 36 und 38).

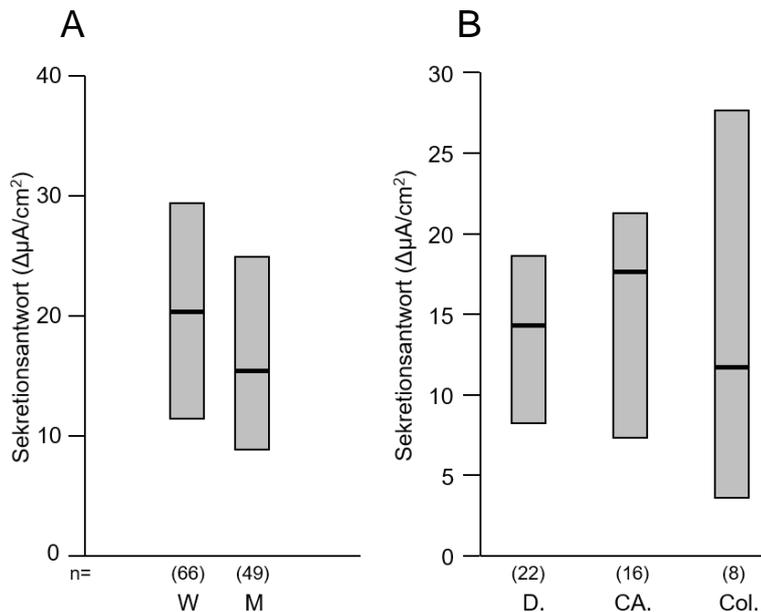


Abb. 40: Es gab keinen Zusammenhang zwischen Geschlecht der Patienten (A) oder zugrunde liegender Erkrankung (B). Dehnungsinduzierte Sekretionsantwort nach 20 mmHg serosaler Rampenstimulation. Basis sind 115 Gewebe aus verschiedenen Colonregionen. Verglichen wurden Divertikulitis (D.), Karzinom (CA.) und Colitis (Col.) Gruppen.

3.2.13. Serosal und mucosal stimulierte Ileumgewebe

Analog zu den Dickdarm-Versuchen wurden auch einige Dünndarmproben des Ileums untersucht.

Sowohl bei den serosalen als auch den mucosalen Stimulationsantworten zweier Beispielstimulationen zeigte sich ein druckbedingtes Artefakt, welches die Messung nicht beeinträchtigte (Abb. 41 A). Die Form der Kurve nach dem Artefakt zeigte die für Humangewebe typische monophasische Antwort. Die Abnahme der Höhe der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort von serosaler zu mucosaler Stimulation war in diesem Gewebe sichtbar. Im Vergleich aller Ileumgewebe war diese Abnahme jedoch nicht signifikant, da der Effekt unterschiedlich stark ausfiel.

Zur Überprüfung der nervalen Komponente bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort wurde auch im Ileum TTX bei serosaler wie auch mucosaler Stimulation eingesetzt. Im Vergleich der Kontrollen gegen die Stimulation in TTX zeigte sich bei den serosalen Stimulationen (Paired t-test, $p < 0,001$) wie auch bei den mucosalen Stimulationen (Paired t-test, $p = 0,036$) eine signifikante Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (Abb. 41 C, Tabelle 23, 24 und 38).

Die Sekretionsantworten aller untersuchten Gewebe der repetitiven Rampenstimulation ergaben keine signifikanten Unterschiede (Abb. 41 B, Tabelle 17 und 38).

Zudem wurden die dehnungsinduzierten Sekretionsantworten der serosalen und mucosalen Stimulation verglichen, wobei sich kein signifikanter Unterschied zeigte (Abb. 41 D, Tabelle 20 und 38).

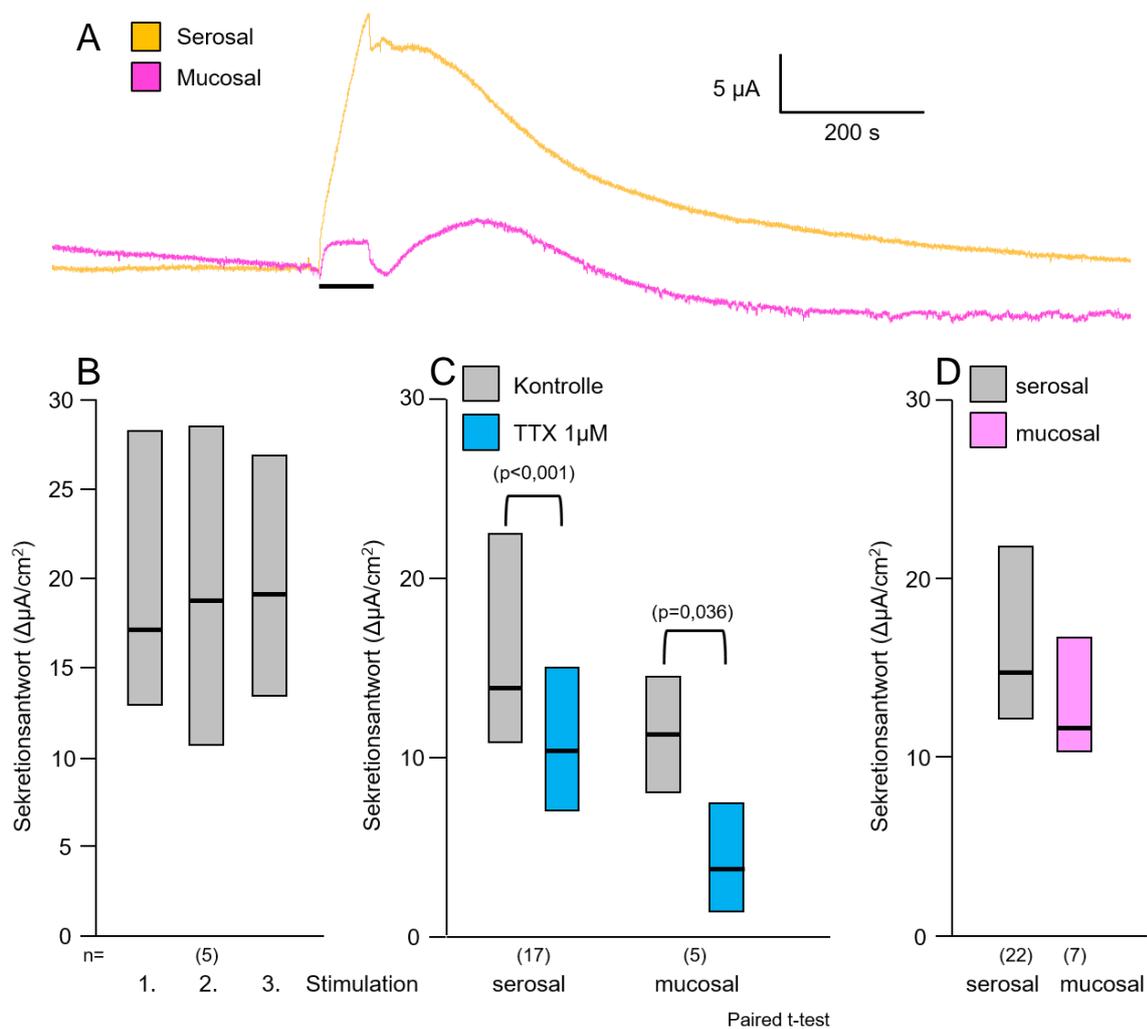


Abb. 41: Vergleiche der 20 mmHg dehnungsinduzierten Sekretionsantworten (μ A/cm²) im Ileum. A: Beispielgraphen der serosalen und mucosalen dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (μ A, y-Achse) pro Zeit (s, x-Achse). Die Druckapplikation ist mit einem Balken gezeigt (Dauer 60 s). B: Repetitive serosale Stimulationen zeigten bei zwei Patienten keinen Unterschied. C: serosale und mucosale Stimulationen zeigten eine TTX-Sensitivität ($p<0,05$). D: Serosale und mucosale Stimulationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Somit zeigten die Versuche mit Ileumgewebe keine Unterschiede bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort zwischen serosaler und mucosaler Stimulation, jedoch eine TTX-Sensitivität bei sowohl serosaler als auch mucosaler Stimulation.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die dehnungsinduzierte Sekretion und die dabei beteiligten Akteure mittels der Voltage-Clamp-Methode in der Ussingkammer gewonnen. Hierbei wurden erstmalig Versuche an Humandarmproben durchgeführt und zusätzlich das Meerschweinchen als Modell genutzt.

In den Versuchen konnte dabei gezeigt werden, dass die Dehnung eine Sekretionsantwort in Human- und Meerschweinchen-Darmproben auslöst. Bei Humangewebe wurde gezeigt, dass die Anionen Chlorid und Bikarbonat dabei die dehnungsinduzierte Sekretion vermitteln, da in Chlorid- und Chlorid/Bikarbonat-freien Versuchslösungen die dehnungsinduzierte Sekretion signifikant reduziert wurde. Eine gezielte Reduktion der Dehnung durch Kompression der Gewebe mittels eingebauten Filtern zeigte, dass die druckinduzierte Sekretionsantwort vor allem durch Dehnung und nicht durch Kompression hervorgerufen wird. Zudem war die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort abhängig von der Höhe des Druckes, wobei höhere Drücke auch höhere Sekretion im Gewebe des Menschen hervorriefen. Im Mensch war es in vier der fünf untersuchten Dickdarmregionen entscheidend, ob der Druck von serosaler oder von mucosaler Seite erfolgte, da mucosale Stimulationen weniger starke Sekretionsantworten auslösten. Prostaglandine spielen eine zentrale Rolle bei der dehnungsinduzierten Sekretion, da der Cyclooxygenasehemmer Piroxicam die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort signifikant in Meerschweinchen und Mensch reduzierte. Durch anschließende Applikation von TTX zeigte sich die dominante nicht nerval vermittelte Prostaglandin-Beteiligung im Menschen, weil sich erst nach Hemmung der Prostaglandinwirkung die geringe nervale Komponente offenbarte. Zudem zeigte sich eine Bedeutung der synaptischen Übertragung bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort durch Versuche mit ω -Conotoxin GVIA im Menschen.

Das Luftvolumen welches mittels der selbstgebauten Pumpeneinheit in den Experimenten appliziert wurde, lag bei Standard Rampendruck (20 mmHg) bei den Versuchen mit Meerschweinchen-Colon um 26,3% höher als bei Versuchen mit Dickdarm des Menschen. Diese Volumenunterschiede ergeben sich durch die heterogenen Dehnbarkeiten der Darmpräparate von Meerschweinchen und Mensch, welche bereits bei der Präparation beobachtet werden konnten. Die Arbeitsgruppen

um Frieling et al. und Diener et al. nutzten bei Meerschweinchen- bzw. Rattencolon andere Methoden der Druckapplikation als sie in den Versuchen dieser Arbeit Verwendung fanden (Diener und Rummel, 1990; Frieling et al., 1992).

Die Mehrheit der hier untersuchten Humangewebe erreichte das Maximum der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort erst nachdem die Druckstimulation bereits beendet war. Im Falle der Meerschweinchengewebe wurde das Maximum meist schon während der Druckapplikation erreicht. Eine Erklärung hierfür könnte wieder die Dehnbarkeit des Gewebes sein. Basierend auf direkten Beobachtungen der Gewebe bei Aufbau einer Halbkammer zeigte sich, dass die Dehnung beim Meerschweinchen schneller und prominenter in Erscheinung tritt als beim Humangewebe. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt sich auch auf die Geschwindigkeit der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort auswirkt, so dass die Maxima im Meerschweinchencolon früher als im Humancolon erreicht werden.

Dabei ist zu beachten, dass die verglichenen Drücke in den Versuchen bei Meerschweinchen und Mensch identisch waren, während die Gesamtwandstärke in beiden Spezies jedoch unterschiedlich ist. Die Wandstärken lagen beim Meerschweinchen zwischen 0,8 und 0,9 mm sowie beim Menschen laut eigenen Cryoschnitten bei $1,1 \pm 0,2$ mm. Laut CT-Vermessungen liegen die Wanddicken abhängig vom Durchmesser zwischen 0-8 mm im Colon des Menschen (Wiesner et al., 2002; Zhao et al., 2010). Somit zeigen sich schon in der Literatur bezüglich der Darmwanddicken enorme Variationen, die sicher auch für die Dehnbarkeit des Gewebes gelten.

Bei Versuchen mit Dickdarmgewebe des Menschen konnte in den Versuchen bewiesen werden, dass die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort bei höheren Drücken auch höhere Sekretionen im Menschen hervorrief. Auch das Dehnungsvolumen korrelierte mit der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort. Es ist denkbar, dass es sich um einen Transport- und Schutzmechanismus handelt. Das Prinzip wäre hierbei: Je stärker der Druck, desto mehr sollen Darminhalte vorangetrieben werden. Daher wird vermehrt mittels Sekreten und weiteren Bestandteilen des Mucus „geschmiert“ (Paone und Cani, 2020). Die schützende Funktion bestünde dabei darin, Zellreste und Bakterien durch „Ausschwemmung“ zu entfernen (Greenwood und Davison, 1987).

Zudem werden durch Pathogene Abwehrmechanismen in Form der Ausschwemmung, was sich als Diarrhoe manifestieren kann, ausgelöst (Cooke, 2006).

Das applizierte Dehnungsvolumen lag in dieser Arbeit in einem ähnlichen Bereich wie bei Frieling et al., welche zur Dehnungsinduktion jedoch die Volumina über ein Schlauchsystem serosal abgezogen hatten, was eine Dehnung in serosaler Richtung hervorrief (Frieling et al., 1992). Diener et al. erzeugten die Dehnung des Gewebes durch Verschließen der serosalen Kammerhälfte unter fortlaufender Begasung, was zu einer Dehnung in mucosaler Richtung führte. Die Dehnung wurde mit 2-3 mm Ausbeulung angegeben (Diener und Rummel, 1990). Bei Beobachtungen der Dehnung in der Halbkammer der Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Dehnungen in diesen Größenordnungen beim Meerschweinchen und Mensch erfasst.

Die von Frieling et al. verwendeten Meerschweinchen-Mucosa/Submucosa-Präparate, wiesen eine Messfläche von 0,78 cm² und 5 mm Radius auf (Frieling et al., 1992). Basierend auf den Vergleichen unterschiedlicher Messflächen in dieser Arbeit (0,5 cm² und 1,08 cm²) ist davon auszugehen, dass sich durch eine andere Messflächengröße nach Normierung auf die Fläche 1 cm² keine anderen Sekretionsantworten ergeben würden.

In dieser Arbeit wurden nur makroskopisch unauffällige Humangewebe in den Versuchen verwendet, ein Einfluss der Grunderkrankung kann aber nicht ausgeschlossen werden. Allerdings spielte die Grunderkrankung, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, für die Antworten keine Rolle. Dies entspricht Befunden von Krueger et al. die ebenfalls keinen Einfluss der Grunderkrankung auf neural induzierte Sekretion im Humancolon gefunden haben. Ähnlich wie bei der Studie von Krueger et al. spielte auch in der vorliegenden Arbeit das Geschlecht der Patienten keine Rolle (Krueger et al., 2016).

In den Versuchen dieser Arbeit zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge der Widerstände der Gewebe ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) mit dem Alter der Patienten. Dass sich mit dem Alter der Widerstand weder im Dick- noch im Dünndarm des Menschen veränderte, deckte sich ebenfalls mit den Erkenntnissen von Krueger et al. (Krueger et al., 2016).

Na⁺-Absorption und Cl⁻-Sekretion machen die Mehrheit der Ionenflüsse in den Epithelzellen des Darmes aus (Sandle, 1998). Eine Differenzierung zwischen Na⁺-Absorption und Cl⁻-Sekretion kann jedoch Anhand der in der Ussingkammer gemessenen Kurzschlussstromänderung nicht stattfinden. Daher wurde in den

Versuchen dieser Arbeit, wie auch bei Frieling et al. Amilorid (10 μM) mucosal von Beginn des Experimentes an appliziert, welches keine signifikante Änderung der dehnungsinduzierten Sekretion hervorrief (Frieling et al., 1992). Durch Amilorid können die ENaC und weitere Amilorid-sensitive Na^+ -Kanäle blockiert werden. Somit konnte in den Versuchen die Cl^- -Sekretion separat betrachtet werden.

Die signifikante Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in Cl^- - oder $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -freier Versuchslösung war durch Auswaschen mit Standardlösung in den Versuchen dieser Arbeit am Humancolon reversibel und es lässt sich somit schlussfolgern, dass im Dickdarm des Menschen die dehnungsinduzierte Sekretion über Chlorid und Bikarbonat vermittelt wird. Bei Frieling et al. zeigte sich im Meerschweincolon eine signifikante Reduktion der schnellen und langsamen Antwort in Cl^- -freier Lösung (Frieling et al., 1992). Diener et al. zeigten im Rattencolon ebenfalls eine Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort durch Cl^- -freie Lösung, welche reversibel war (Diener und Rummel, 1990).

Dass sowohl Cl^- als auch HCO_3^- einen starken Beitrag an der durch enterische Nerven vermittelten Sekretionsantwort des Menschen hatten, bewiesen Krueger et al. in ihren Versuchen an Humangewebe von Dick- und Dünndarm. Zudem zeigten sie auf, dass ein Cl^- -Mangel in der Cl^- -freien Lösung funktionell durch HCO_3^- kompensiert werden könnte (Krueger et al., 2016). Die HCO_3^- -Sekretion wie auch ein bedeutender Teil der Cl^- -Sekretion tritt im Menschen durch den CFTR-Kanal aus, welcher vor allem in den Krypten der Darmschleimhaut lokalisiert ist (Bachmann und Seidler, 2011; Barrett und Keely, 2000).

In HCO_3^- -freier aber Cl^- -haltiger Lösung ergab sich dagegen sowohl im Meerschweinchen wie auch in der Ratte kein Einfluss auf die Sekretionsantwort (Diener und Rummel, 1990; Krueger et al., 2016). Es ist davon auszugehen, dass es sich um spezies-spezifische Unterschiede handelt, wobei die HCO_3^- -Sekretion keine Bedeutung bei der Sekretion in Meerschweinchen und Ratte hat. Es ist daher denkbar, dass im Epithel des Meerschweinchens die Sekretion fast ausschließlich durch luminale Cl^- -Sekretion vermittelt wird (Krueger et al., 2016). Bei Versuchen mit Mäusedarm führte die Abwesenheit oder Blockade von HCO_3^- jedoch zu reduzierter Sekretion von Mucus, wobei der CFTR eine wichtige Rolle spielte (Garcia et al., 2009). Basierend auf dieser Erkenntnis, wäre die Maus ein geeignetes Modell für die Sekretion im Humandarm.

Zu starke Kontraktionen des Darmes oder zu hohe Drücke im Darm werden meist durch pathologische Vorgänge des Körpers oder Pathogene ausgelöst (Gayer und Basson, 2009; Greenwood und Davison, 1987). Oft sind diese von der bereits zuvor erwähnten Diarrhoe begleitet. Bei Diarrhoe kommt es dabei zum Wasser- und Elektrolytverlust (Cooke, 2006). Daher muss der Darm die Sekretionsmenge permanent adaptieren und kann nicht eine gleichbleibende Menge an Flüssigkeit sekretieren. In den hier vorliegenden Versuchen wurden die Dehnungsstimulationen mit einem Standarddruck von 20 mmHg durchgeführt. Laut Literatur liegen physiologische Drücke im Dickdarm bei manometrischen Messungen im Bereich von 10-30 mmHg (Huizinga und Chen, 2021). Somit lag auch der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Druck von 20 mmHg in einem mittleren-, physiologischen Bereich, welcher es ermöglichte, sowohl Sekretionssteigerungen wie auch Reduktionen mittels Kurzschlussstrom zu erfassen.

Um eine Darmkontraktion nachzubilden wurden die Gewebe in dieser Arbeit in der Ussingkammer serosal stimuliert und dabei in mucosaler Richtung ausgeweitet, wobei dies einer Dehnung ins Darmlumen hinein entspricht. Umgekehrt wurden mucosale Stimulationen genutzt um eine Dehnung des Darmes vom Lumen aus zu beschreiben, wie sie beispielsweise bei einer Relaxation der Darmmuskulatur bei Vorhandensein von Faeces oder Gasen entstehen kann.

Die serosal dehnungsinduzierte Sekretion an Dickdarmproben des Menschen zeigte hierbei Unterschiede zwischen allen Regionen untereinander auf. Einzige Ausnahme waren hierbei Colon sigmoideum/Rectum zu Colon descendens, da sich hier keine signifikanten Unterschiede zeigten. Das Colon transversum reagierte mit der höchsten dehnungsinduzierten Sekretionsantwort, Colon descendens sowie Colon sigmoideum/Rectum mit den niedrigsten Antworten. Es wurde bereits in anderen Studien gezeigt, dass die Dehnung von Darmgewebe und die Sekretion eng miteinander verbunden sind (Diener und Rummel, 1990). Da alle Gewebe in dieser Arbeit mit derselben Vorspannung auf die Gewebekammer aufgebracht wurden, kann die Vorspannung keine Erklärung für regionale Unterschiede liefern.

Im distalen Colon dienen zyklische motorische Muster der Regulierung der Füllung des Rectums (Heitmann et al., 2021; Lin et al., 2017). Es ist wahrscheinlich, dass im Rahmen dieser zyklischen Kontraktionen eine geringere Sekretion im distalen Colon ausreichend ist um den Transport des Faeces zu gewährleisten, dabei den Stuhl zu formen jedoch nicht mehr zu verflüssigen.

Beim Colon transversum handelt es sich um ein langes Dickdarmsegment und das einzige mit einem horizontalen Verlauf. Somit wäre die hohe Sekretion im Colon transversum als Selbstschutz des Darmes an sich denkbar, da die Gefahr eines Ileus bei bereits zu hartem Stuhl vorhanden wäre. Die erhöhte Sekretion würde den Weitertransport des Faeces bei Kontraktionen unterstützen und die Viskosität des Stuhles beeinflussen (Greenwood und Davison, 1987). Sekretion von Mucus, welcher zu 90-95 % aus Wasser besteht, ist sowohl als Schmierfilm bei der Passage als auch zum Schutz vor mechanischer Belastung der Epithelzellen von Bedeutung (Paone und Cani, 2020).

Mucosale Stimulationen ergaben in den Versuchen niedrigere Sekretionsantworten als serosale Stimulationen, mit Ausnahme des Colon descendens. Da die bestimmten Dehnungsvolumina nur im Colon descendens mucosal niedriger waren als serosal, ist das benötigte Volumen keine generelle Erklärung für die Unterschiede in der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort von serosal zu mucosal. Die Dauer wies ebenfalls keine Zusammenhänge mit der Höhe der Sekretionsantwort auf.

Es macht also allgemein für den Dickdarm des Menschen einen Unterschied, ob die Dehnungsstimulation von außerhalb oder von innerhalb des Darmes kommt. Eine mögliche Begründung für eine niedrigere mucosal stimulierte dehnungsinduzierte Sekretion lieferten Diener et al.. Da vor allem die Krypten den Ort der Sekretion im Darm darstellen, kann es durch die Kompression der Schleimhautseite dazu kommen, dass die Kryptenöffnungen durch das Zusammendrücken verschlossen werden. Dies führt dann wiederum zur Beeinträchtigung der Sekretionsantwort (Diener und Rummel, 1990). Zudem ist es wahrscheinlich, dass der Unterschied des eingeleiteten Drucks serosal zu mucosal eng mit der peristaltischen Aufgabe und somit dem Transport des Chymus verbunden ist. Zum Schutz des Darmes und der Sicherstellung des Weitertransportes des Nahrungsbreies folgt nach serosaler Dehnung daher eine Erhöhung der Sekretion. Umgekehrt ist es denkbar, dass die Sekretionsleistung im relaxierten Zustand des Darmes weniger stark ansteigt, da hier keine propulsive Bewegung stattfindet und der Darm zudem von Innen durch den Chymus ausgeweitet werden kann.

Erste Versuche am Ileum zeigten keine Unterschiede zwischen serosaler und mucosaler Stimulation in Bezug auf dehnungsinduzierte Sekretion. Das Ileum selbst ist wie der gesamte Dünndarm stärker dehnbar als der Dickdarm. Dies begünstigen schon anatomisch diverse Falten der Darmwand sowie eine dünnere Muskulatur

verglichen mit dem Dickdarm. Der Dünndarm hat anders als der Dickdarm nicht das Rückgewinnen von Elektrolyten und Flüssigkeiten als Hauptaufgabe, sondern vor allem die Aufnahme von Nährstoffen aus der Nahrung und das Durchmischen des Nahrungsbreies (Boland, 2016). Jedoch werden im Dünndarm mit ca. 6,5 l Flüssigkeit und Elektrolyten die größten Mengen aufgenommen. Im Dickdarm werden nochmals 1,5 l der verbliebenen Flüssigkeiten absorbiert (Kiela und Ghishan, 2016). Der Inhalt des Dünndarmes ist sehr dünnflüssig, was auch anhand der niedrigeren Drücke des Dünndarmes im Vergleich zum Dickdarm ersichtlich wird (Keller et al., 2018). Daher wäre es denkbar, dass ein Schutzmechanismus im Dünndarm vor inneren Drücken weniger stark ausgeprägt sein muss, als dies im Dickdarm der Fall ist. Zudem ist es wahrscheinlich, dass die Richtung des Druckes, ob vom Lumen oder von außen, im Dünndarm keine Rolle spielt, nur die Stärke des Druckes, da im Falle der Kontraktion eine generelle Bewegung und Verflüssigung des Stuhls erfolgt. Steigt der Druck genug an, öffnet sich zudem die Ileozökalklappe zum Colon ascendens. Die Erhöhung der Sekretion unterstützt den Weitertransport in den Dickdarm.

Wenn man die physiologische Peristaltik des Humandarmes betrachtet, liegen die Werte bei 2-13 Kontraktionen pro Minute im Dickdarm, im Dünndarm sogar bei 7-20 (Gayer und Basson, 2009; Pervez et al., 2020). Im Colon kommen sowohl phasische Kontraktionen, welche wenige Sekunden dauern, sowie tonische Aktivität vor, wobei sich der Muskeltonus über Minuten erhöhen oder erniedrigen kann (Keller et al., 2018).

Bisher wurden die genannten Versuche dieser Arbeit mit 20 mmHg Druckstimulus bei 60 s Dauer (Rampe) ausgeführt, welche einer tonischen Aktivität entsprechen können. Zusätzlich wurde mit zehn kurzen Druckstößen von je 5 s Dauer bei 20 mmHg stimuliert, welche phasische Aktivitäten darstellen können.

Die serosal und mucosal gepulsten Stimulationen wurden miteinander verglichen. Dabei zeigte sich im Colon ascendens und Colon sigmoideum/Rectum eine signifikant niedrigere dehnungsinduzierte Sekretionsantwort bei mucosaler Stimulation. Da sich durch die gepulste Stimulation die Gesamtdauer des höchsten Druckes verringerte (von 60 s auf 50 s mit 20 mmHg) ist es möglich, dass dieser Druck nicht mehr ausreichte, um Unterschiede in den Regionen Colon transversum und Colon descendens auszulösen. Es ist denkbar, dass die von Pausen unterbrochenen Intervalle, in denen der Zieldruck erreicht war, als Stimulus in diesen Regionen nicht mehr für stärkere Antworten ausreichte. Bei einer Betrachtung der Ergebnisse ist im

Colon transversum die wahrscheinlichste Begründung für die fehlende Signifikanz eine zu geringe Anzahl der Gewebe. Dennoch lässt sich anhand der Ergebnisse sagen, dass eine Summation von Einzelpulsen im Dickdarm des Menschen stattfindet, und es auch gepulst zu einer Sekretionssteigerung kommt.

Um tonische und phasische Kontraktionen des Darmes nachzubilden, wurden im Mensch und im Meerschweinchen zudem Versuche mit verschiedenen schnellen Pumpeneinstellungen durchgeführt wobei sich weder im Meerschweinchen noch im Mensch Unterschiede in der Höhe der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort durch verschiedenen schnelle Applikationsgeschwindigkeiten zeigten. Eine schnelle Applikationsgeschwindigkeit (500 $\mu\text{l/s}$) entsprach hier der Dauer einer durchschnittlichen schnellen phasischen Kontraktion von 4 s, eine langsame (50 $\mu\text{l/s}$) der langsamen phasischen Kontraktion von 21 s im Colon (Bueno et al., 1980). Für die Nachbildung der tonischen Kontraktionen eignete sich ebenfalls die langsame Stimulation, welche den beschriebenen langsamen, jedoch langanhaltenden Kontraktionen entsprechen könnte (Keller et al., 2018). Es ist denkbar, dass die Reaktion des Darmes auf den Dehnungsreiz zu träge einsetzte, um eine erhöhte dehnungsinduzierte Sekretionsantwort auszulösen. Physiologisch macht dies auch aus dem Blickwinkel kurzfristig inhomogener Druckverteilungen durch beispielsweise unverdauliche Nahrungsbestandteile durchaus Sinn, da der Darm sonst durch unangebracht erhöhte Sekretion eine Diarrhoe auslösen würde. Erst bei längeren Kontakten zur Mucosa würde eine Reaktion hervorgerufen werden.

Beim Menschen ergaben sich auch bei schneller Applikation keine nervalen Einflüsse, jedoch bei schneller Applikation im Meerschweinchen. Dass die Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Frieling et al., Diener et al. und der vorliegenden Arbeit auf Grund verschiedener Versuchsbedingungen auftraten, ist wie bereits diskutiert wahrscheinlich. In den Versuchsaufbauten von Frieling et al. wurden die Volumina zur Dehnungsapplikation sehr schnell abgezogen (persönliche Mitteilung). Im Falle der Versuche von Diener et al. wurde Rattencolon untersucht, bei welchem speziesspezifische Unterschiede bei der Reaktion auf die Geschwindigkeit der Druckgabe denkbar sind (Diener und Rummel, 1990).

Die Neurone werden wie auch die Zellen der Darmwände den unterschiedlichsten physikalischen Kräften wie Kontraktionen und Kompressionen sowie den dadurch entstehenden Verformungen ausgesetzt (Gayer und Basson, 2009; Mazzuoli-Weber

und Schemann, 2015). Daher wurde die Frage aufgeworfen, ob Neurone an der dehnungsinduzierten Sekretion beteiligt sind. Naheliegend für diese Aufgabe wären die mechanosensitiven enterischen Neurone (MEN), welche auf Drücke der Darmwand reagieren (Mazzuoli und Schemann, 2009; Mazzuoli-Weber und Schemann, 2015). Diese MEN sind auch im SMP vorhanden (Kreutz, 2018). Daher wurde in den Versuchen dieser Arbeit TTX verwendet, bei welchem es sich um einen spezifischen Blocker spannungsaktivierter Natriumkanäle auf Neuronen handelt, um die neuronale Beteiligung an der dehnungsinduzierten Sekretion zu untersuchen.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde eine biphasische Form der dehnungsinduzierten Sekretionsantworten beim Meerschweinchen festgestellt, welche ebenfalls von Frieling et al. als eine schnelle, großamplitudige und eine eher gering amplitudige, dafür länger anhaltende Phase beschrieben wurde. Auffällig ist, dass in den Ergebnissen von Frieling et al. im Meerschweinchen die zweite Phase der Antwort TTX-sensitiv war (Frieling et al., 1992). Auch Diener et al. zeigten am Rattencolon eine Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretion in TTX um 30-40% sowie ebenfalls das Blockieren der langsamen Phase der Sekretion (Diener und Rummel, 1990). Bei den Versuchen mit Humangewebe zeigte sich eine monophasische Sekretionsantwort, welche weniger stark und langsamer als die zweite Phase der Meerschweinchen-sekretion war. Die monophasische Antwort des Humangewebes war hierbei TTX-insensitiv. Welche Mediatoren jeweils die erste und zweite Phase der Antwort vermitteln, bleibt jedoch unbeantwortet.

Es zeigte sich im Meerschweinchen bei den Versuchen dieser Arbeit weder bei Betrachtung von Ganzwand-Präparaten mit MP und SMP, noch bei Mucosa/Submucosa-Präparaten mit dem SMP bei serosaler Dehnung eine Sensitivität auf TTX, außer bei der schnellen Druckapplikation und bei Geweben ohne Vorspannung im Meerschweinchen.

Eine Unwirksamkeit von TTX bei diesen Versuchen kann durch seine blockierende Wirkung auf die rein elektrisch vermittelte Sekretionsantwort, welche durch den Versuchsaufbau gemäß Krueger et al. überprüft wurde, im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden (Krueger et al., 2016).

Der reduzierende Effekt auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort von TTX beim Meerschweinchen wurde von Frieling et al. beschrieben, wobei hier der Effekt der

nervalen Beteiligung gering war, da die Antwort nicht komplett geblockt wurde (Frieling et al., 1992).

Die Applikation von TTX sowohl von mucosaler als auch von serosaler Seite ergab keine Unterschiede bezüglich der Wirkung auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort im Meerschweinchen. Jedoch zeigte sich in diesen Versuchen eine Blockierung der elektrisch stimulierten Sekretion. Dies bestätigte, dass TTX sowohl bei serosaler wie auch bei mucosaler Applikation die TTX-sensitiven neuronal exprimierten Na⁺-Kanäle hemmte. Allerdings wäre ein Unterschied bei einem direkten Kontakt zu TTX denkbar gewesen, da auch nicht neuronale Epithelzellen Aktionspotentiale generieren können (Gribble und Reimann, 2016). Der Kontakt zu diesen TTX-sensitiven Zellen der Mucosa vom Lumen aus wirkte sich aber in diesen Versuchen nicht auf die dehnungssensitive Sekretionsantwort aus.

Auch im Dickdarm des Menschen wurden Mucosa/Submucosa-Präparate mittels Druckstimulation untersucht, wobei die Mehrzahl der dehnungsinduzierten Sekretionsantworten eine monophasische, anstatt einer wie im Meerschweinchen üblichen biphasischen Antwort zeigte. Bei Diener et al. wurden monophasische Antworten in Präparaten ohne SMP erzielt (Diener und Rummel, 1990). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit waren die Neurone des SMP vital, was die Erhöhung der Sekretion durch elektrische Stimulation bewies.

Es zeigte sich im Falle der serosalen Druckstimulation lediglich im Colon ascendens eine TTX-Sensitivität. Bei mucosaler Stimulation zeigte sich in keiner Region eine TTX-Sensitivität. Interessanterweise ergaben erste Versuche mit Ileumgewebe ebenfalls eine TTX-Sensitivität sowohl bei serosaler als auch bei mucosaler Stimulation. Ein gepulster Druckstimulus in Dickdarmpräparaten erbrachte keine TTX-sensitiven Antworten. Auffällig ist bei den Regionen mit nervaler Beteiligung, dass es sich um Dünndarm und ein an diese Region angrenzendes Stück des Dickdarmes handelt. Es ist denkbar, dass sich hier Unterschiede durch eine dünnere Viskosität des Stuhles ergeben, welcher im weiteren Verlauf des Darmes zunehmend eingedickt wird.

Frieling et al. erzeugten für die pharmakologische Untersuchung der Meerschweinchengewebe durch Abziehen von Lösung lumenale Ausbeulungen von 40% höheren Drücken als in vivo im Colon des Meerschweinchens vorherrschen (Frieling et al., 1992; Kwak et al., 2013). Dies könnte Auswirkungen auf die Messergebnisse haben. Diener et al. erzeugten den Druck durch Abdichten der Kammer unter fortlaufendem

Einstrom der Begasung, wobei die Drücke von $12,9 \pm 0,7$ mmHg ebenfalls deutlich höher lagen als die physiologischen Drücke im Rattencolon von $0,3 \pm 0,1$ mmHg (Diener und Rummel, 1990; Kubota et al., 2019).

Da die Reaktion der Mucosa eher träge erfolgt, wäre es denkbar, dass der Block der schnellen nervalen Antwort durch TTX im Falle der Meerschweinchenversuche bei der mittleren und langsamen Stimulationsgeschwindigkeit durch die langsamere Reaktion der Mucosa selbst überdeckt wurde. Bei der schnellen Stimulation bei 20 mmHg Druck kam dann vor allem die neuronale Komponente zum Tragen, da der Mucosa-vermittelte Anteil der Sekretionsantwort wenig oder nicht mehr vorhanden war. Im Mensch ergab sich somit eine neuronale Komponente der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort, welche jedoch von anderen Wirkmechanismen, wie z.B. den Prostaglandinen, überdeckt wurde.

Diese fehlende nerval vermittelte dehnungsinduzierte Sekretionsantwort könnte seine Ursache aber auch in einer verminderten Aktivität der Neuronen gehabt haben. Um diese zu überwinden, wurden daher Versuche an Meerschweinchendarmpräparaten durchgeführt, in welchen das Membranpotential der Neurone erhöht und somit deren Aktivität mittels hoher KCl-Konzentration gesteigert wurde. Es zeigte sich jedoch ebenfalls kein Einfluss der neuronalen Aktivität. Zusammen mit den vorangegangenen TTX-Versuchen ist es wahrscheinlich, dass die Nerven keinen oder nur wenig Einfluss auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort haben.

In einem Mausmodell des aganglionischen distalen Colon zeigte sich eine unbeeinträchtigte Cl-Sekretion des Colons (Thiagarajah et al., 2014). Daher kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit sowohl beim Meerschweinchen wie auch beim Menschen eine geringe nervale Komponente bei der Sekretion angenommen werden.

Der Neurotransmitter Acetylcholin war bereits von Krueger et al. als einer der prosekretorischen Transmitter bei der elektrisch vermittelten Sekretion bei Humangewebe bestätigt worden (Krueger et al., 2016). Da sich erst nach Einsatz des Acetylcholin-esterasehemmers Neostigmin diese cholinerge Komponente gezeigt hatte, wurde in den Versuchen dieser Arbeit ebenfalls Neostigmin zur Überprüfung der Beteiligung von ACh an der dehnungsinduzierten Sekretion eingesetzt.

Im Meerschweinchen kam es bei Neostigmin zu einer signifikanten Erhöhung der dehnungsinduzierten Sekretion. Auch in Dickdarmproben des Menschen wurden in Neostigmin (1 μM und 5 μM) signifikant die Wirkung des ACh auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort gesteigert. Die hier erzielten Ergebnisse der dehnungsinduzierten Sekretion entsprechen somit denen der elektrisch induzierten Sekretionsantwort von Krueger et al. bei Humanproben. Es zeigte sich im Dickdarm durch Neostigmin eine Erhöhung der elektrisch induzierten Sekretionsantwort (Krueger et al., 2016). Es ergab sich bei den 5 μM Neostigmin-Versuchen dieser Arbeit keine TTX-Sensitivität. Dies lag an der Zunahme der Sekretionsantwort eines einzelnen Gewebes. Da sich bei Testung ohne dieses Gewebe eine starke TTX-Sensibilisierung ergab, ist nicht auszuschließen, dass durch Neostigmin eine cholinerge Komponente der dehnungsinduzierten Sekretion offengelegt wird. Dies würde sich mit den Erkenntnissen von Krueger et al. decken, wobei eine Maskierung der cholinergen Komponente bei elektrisch induzierter Sekretion durch die hohe Aktivität der Acetylcholinesterase gezeigt wurde (Krueger et al., 2016). Daher sollten weitere Tests mit größerer n-Zahl erfolgen, um Variationseffekte der Gewebe ausschließen zu können.

Zudem wurden Gewebe mit 1 μM Neostigmin und anschließend mit Atropin inkubiert, um Effekte durch vermehrte ACh-Konzentration kompetitiv antagonistisch zu untersuchen. Es wurden bei diesen sechs Geweben jedoch keine signifikanten Unterschiede in der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort festgestellt, weder in Neostigmin noch Atropin. Bei den zuvor beschriebenen 32 Humangeweben mit Neostigmin 1 μM und 5 μM hatte sich hier jedoch ein signifikanter Unterschied ergeben, bei welchem sich ebenfalls Variationen der Antworten mit Zu- oder Abnahmen der Sekretion zeigten, sich jedoch in den meisten Fällen Erhöhungen ergaben. Es zeigten sich in allen 1 μM Neostigmin Versuchen trotz identischer Aliquots des Pharmakons sowie absolut gleichem Versuchsaufbau und Durchführung der Versuche in einem ähnlichen Zeitraum große Variabilitäten der Antworten, was auf eine ebenfalls hohe Variabilität der Cholinesterase-Tätigkeit in den Gewebeproben der Patienten schließen lässt. Daher müssten für die Fragestellung, ob Atropin die Neostigmin-Reaktion bei der dehnungsinduzierten Sekretion aufhebt, erneut Versuche mit deutlich höherer n-Zahl und der erhöhten Neostigmin-Konzentration von 5 μM erfolgen.

Es stellte sich zudem die Frage nach der Bedeutung der synaptischen Übertragung bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort. Um dies zu überprüfen wurde der spannungsabhängige N-Typ Calciumkanalblocker ω -Conotoxin GVIA verwendet, wobei sich im Meerschweinchen kein signifikanter Einfluss auf die dehnungsinduzierte Sekretion ergab. Da zuvor kein TTX-Effekt gemessen wurde, ergab sich wie erwartet keine ω -Conotoxin-Wirkung. Dies legt den Schluss nahe, dass im Meerschweinchen-SMP unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit keine dehnungssensitiven Synapsen beteiligt waren.

Jedoch kam es in Versuchen mit Humancolon zu einer signifikanten Reduktion der Antwort. Dies würde für eine Beteiligung und Existenz von mechanosensitiven Synapsen im Dickdarm des Menschen sprechen. In der Haut sind bereits Merkel-Scheiben als mechanosensitive Synapsen bestätigt worden (Chang et al., 2016). Merkel-Zellen sind auch in der oralen Mucosa vorhanden (Gauweiler et al., 1988). Somit wäre die Existenz von mechanosensitiven Synapsen im Darm durchaus denkbar. In den Versuchen dieser Arbeit hätte TTX in diesem Falle keinen Effekt und die Wirkung von ω -Conotoxin GVIA wäre hingegen direkt sichtbar. Auch wäre ein nicht neural vermittelter Effekt durch das Vorkommen von N-Typ-Calciumkanälen auf Epithelzellen des Colons nicht auszuschließen. Diese wurden bisher nicht auf Epithelzellen, aber bei Zellen des Endothelgewebes nachgewiesen (Ertel et al., 2000; Nishida et al., 2013). Jedoch ist dies eher unwahrscheinlich, da in den Versuchen mit TTX keine Effekte auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort festgestellt wurden. Diese Annahme basiert auf der Erkenntnis, dass ebenfalls elektrische Aktivität und das Feuern von Aktionspotentialen in Epithelzellen des distalen Verdauungstraktes stattfinden (Gribble und Reimann, 2016). Bei einer nicht neuralen Beteiligung der Epithelzellen wären auch diese Aktionspotentiale in den Versuchen durch TTX geblockt worden. Es wären weitere Versuche unter vorheriger Applikation von Piroxicam zum Block der Prostaglandinwirkung mit anschließender Gabe von TTX und darauffolgender Applikation von ω -Conotoxin GVIA sinnvoll. Hiermit würde zuerst die TTX-sensible Komponente der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort ersichtlich. Im Anschluss würde die Komponente der synaptischen Übertragung, welche eine weitere Reduktion der Antwort erwarten ließe, zum Tragen kommen. In den weiteren Publikationen von Frieling et al. und Diener et al. wurde die Frage der nicht neural vermittelten Antwort durch Aktionspotentiale der Epithelzellen nicht beleuchtet. Der entscheidende Unterschied zwischen Ratte, Maus, Meerschweinchen und Mensch

scheint durch dehnungssensitive Zellkörper gegenüber dehnungssensitiven Synapsen zu entstehen.

Durch die Gabe des Cyclooxygenase-Hemmers Piroxicam sollte zudem die Beteiligung von Prostaglandinen an der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort überprüft werden. Im Meerschweinchen und Mensch reduzierte die serosaler Zugabe signifikant die Antworten. Im Mensch reduzierte die zusätzliche TTX-Applikation die Sekretionsantwort erneut signifikant. Hier ist anzunehmen, dass die Prostaglandin Wirkung die neuronale Sekretionsantwort maskierte, da nach einem Block der Prostaglandinsynthese die geringe TTX-sensitive Komponente der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort hervortrat. Somit zeigte sich in diesen Versuchen sowohl im Meerschweinchen als auch im Mensch eine prominente Beteiligung der Prostaglandine an der dehnungsinduzierten und auch der druckvermittelten Sekretion.

Bei Diener et al. zeigte sich in der Ratte in Colon Mucosa/Submucosa-Präparaten ebenfalls eine Reduktion der Sekretion durch den Cyclooxygenase-Hemmer Indomethacin (Diener und Rummel, 1990). Bei Frieling et al. hingegen ergaben sich bei Piroxicam (10 μ M) bei ebenfalls serosaler Gabe keine Effekte auf die dehnungsinduzierte Sekretionsantwort im Meerschweinchen (Frieling et al., 1992). Wie bereits zuvor erwähnt, sind methodische Unterschiede wie sehr hohe, unphysiologische Drücke, vor allem aber sehr schnelle Applikationsgeschwindigkeiten des Druckes eine mögliche Ursache für diese Unterschiede.

Auf dieser Erkenntnis beruhend stellte sich die Frage, ob ohne Dehnungsinduktion die durch Gabe von Prostaglandinen induzierte Sekretionsantwort neural gesteuert sein könnte. Der Vergleich erfolgte durch Applikation von Prostaglandin E₂ serosal sowie durch Prostaglandin-Gabe nach TTX wobei sich keine Unterschiede zeigten. Somit ergab sich keine nervale Komponente der Prostaglandin-induzierten Sekretionsantwort. In den Versuchen dieser Arbeit bestätigte die Applikation von Prostaglandinen eine pro-sekretorische Wirkung. Da auch die Prostaglandin-Sekretionsantwort nicht neural vermittelt war, lässt dies vermuten, dass die dehnungsinduzierte Sekretion zu einem bedeutenden Teil durch Prostaglandin vermittelt ist.

Frieling et al. konnten durch Zugabe von Prostaglandin D₂ eine zusätzliche Erhöhung der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort feststellen (Frieling et al., 1992). Es ist wahrscheinlich, dass diese Wirkung im Meerschweinchen auf eine generelle

Sensibilisierung zurückzuführen ist, da Piroxicam keinen Einfluss auf die dehnungsinduzierte Sekretion aufwies und sich dieser Effekt sonst nicht erklären ließe.

Diener et al. vermuteten nach einer Reduktion der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort nach Applikation des Cyclooxygenase Hemmers Indomethacin, eine wichtige Rolle der Prostaglandine. Eine mögliche Erklärung sei, dass die Dehnung Prostaglandine freisetze, welche über einen direkten Effekt durch Binden der Rezeptoren am Epithel oder indirekt über den SMP wirkten und die Chlorid-Sekretion auslösten (Diener und Rummel, 1990).

Die Ergebnisse aus den Versuchen der vorliegenden Arbeit legen ebenfalls den Schluss nahe, dass durch Dehnung freigesetzte Prostaglandine an der Mucosa lokale Wirkungsmechanismen aktivieren, welche die Sekretion aktivieren oder modulieren können und diesen Prozess unabhängig vom SMP ausüben (Schulzke et al., 1995).

Bei der Untersuchung der Mechanosensitivität sind auch die dehnungsaktivierten Ionen-Kanäle, welche an der Vermittlung von Dehnungsreizen beteiligt sind, von Bedeutung. Hierzu wurden Gadolinium-sensitive dehnungsinduzierte Ionenkanäle auf SMP Neuronen durch Gadolinium gehemmt (Weber et al., 2001).

Da sich sowohl die Ionenradien von Gd^{3+} und Ca^{2+} als auch Bindungsverhalten und Koordinationsverhalten ähneln, wird davon ausgegangen, dass die Ca^{2+} -Kanäle durch Gadolinium verschlossen werden können (Adding et al., 2006).

Am Meerschweinchencolon wurden neuronale Schaltkreise identifiziert, die eine erhöhte Chloridsekretion als Reaktion auf eine Gewebedehnung vermitteln. Die Aktivierung dehnungssensitiver Neurone hängt hierbei auch von der Öffnung Gadolinium-sensitiver dehnungsaktivierter Ionenkanäle ab (Weber et al., 2001).

Im Meerschweinchen wie auch im Mensch waren keine Gadolinium-Effekte auf die dehnungsinduzierte Sekretion in den Versuchen dieser Arbeit zu sehen, obwohl eine Reduktion der Sekretionsantwort erwartet hätte werden können.

Zusätzliche Gaben von TTX zeigten TTX-sensitive Effekte der bereits mit Gadolinium inkubierten Humangewebe. Welcher Effekt durch Gadolinium vermittelt wird, der im Anschluss die TTX-sensitive Komponente offenlegt, ist bisher ungeklärt. Da Gadolinium eine Reihe unspezifischer Wirkungen haben kann, ist hier eine eindeutige Antwort zur Beteiligung an der dehnungssensitiven Sekretionsantwort nicht möglich.

Da keine Veränderungen der Basislinie durch Gadolinium auftraten, scheint eine nervale Beteiligung unwahrscheinlich.

Da Serotonin (5-HT) mit vielen Prozessen des Darmes in Verbindung steht, sollte dessen Rolle ebenfalls überprüft werden. Es ist bekannt, dass durch Druck auf die Darmwand, was beispielsweise bei einem Füllungsdruck des Darmes der Fall wäre, die 5-HT Freisetzung ebenfalls erhöht wird (Bülbring und Crema, 1959). Die sensorisch aktiven enterochromaffinen Zellen im enterischen Epithel speichern über 90% der 5-HT-Menge des Körpers und setzen diese bei Stimulation frei (Gershon, 2004).

Mittels des 5-HT₃-Antagonisten Tropisetron sollte überprüft werden, ob der 5-HT₃-Rezeptor bei der dehnungsinduzierten Sekretion im Darm des Menschen beteiligt ist. Bisher gibt es im Humandarm kein funktionelles Korrelat der neural exprimierten 5-HT₃-Rezeptoren, da weder der 5-HT-Agonist eine Wirkung auf die basale Sekretion hatte, noch ein 5-HT₃-Antagonist einen Effekt auf die elektrisch induzierte Sekretion ausübte (Michel et al., 2005).

Um enterochromaffine Zellen vermehrt zu aktivieren wurde in den Versuchen dieser Arbeit mucosal stimuliert um die Freisetzung von 5-HT zu forcieren. Es zeigte sich eine Erhöhung der dehnungsinduzierten Sekretion durch den Block der 5-HT₃-Kanäle. Dem 5-HT₃-Rezeptor kommt somit eine nicht zu erklärende, hemmende Wirkung auf die dehnungsinduzierte Sekretion zu.

Ein denkbarer Mechanismus wäre hier analog zum Rattencolon, dass es bei einer 5-HT₃-Rezeptor-Aktivierung im SMP zur Unterdrückung der von 5-HT induzierten Ionensekretion durch Freisetzung von Somatostatin aus submukösen Neuronen kommt (Yang et al., 2010). Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen dieser Arbeit, wonach TTX keinen Effekt auf die durch 5-HT₃-Block vermittelte Erhöhung der dehnungsinduzierten Sekretion hatte. Jedoch finden sich 5-HT₃-Rezeptoren nicht ausschließlich auf Neuronen sondern auch auf Zellen des intestinalen Epithels (Day et al., 2005). Im Colon des Meerschweinchens spielte der 5-HT₃-Rezeptor keine Rolle bei der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort (Frieling et al., 1992). Auch das oben genannte Mausmodell mit aganglionischem Colon könnte die geringe nervale Beteiligung an der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort und somit die fehlende TTX-Sensitivität erklären (Thiagarajah et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die druckinduzierte sekretorische Antwort in Humanpräparaten primär durch Dehnung, nicht aber durch Kompression hervorgerufen wird. Luminal gerichtete Chlorid- und Bikarbonatfluxe sind für die erhöhte Sekretion verantwortlich. Die dehnungsinduzierte Sekretion war abhängig vom absoluten Druck, wobei die untersuchten Drücke von 2-60 mmHg den physiologisch auftretenden Kontraktionsstärken entsprachen. Die Stärke der sekretorischen Antwort war regionenabhängig mit der höchsten Antwort im Colon transversum. Generell reagierten die Gewebe auf serosale Druckapplikation sensitiver als auf mucosale Stimulation. In Versuchen an Meerschweinchencolon konnte gezeigt werden, dass die nervale Beteiligung an der Sekretion mit der Geschwindigkeit zunahm. In Humanpräparaten war die dehnungsinduzierte Sekretion hingegen primär abhängig von einer Prostaglandinausschüttung und einer direkten Aktivierung der Epithelzellen. Die nervale Komponente, die auch mechanosensitive Synapsen einschloss, war eher gering, wenn auch signifikant. Acetylcholin ist einer der Neurotransmitter, der an der dehnungsinduzierten Sekretion beteiligt ist.

5. Literaturverzeichnis

Adding, L.C., Bannenberg, G.L., Gustafsson, L.E., 2006. Basic Experimental Studies and Clinical Aspects of Gadolinium Salts and Chelates. *Cardiovasc. Drug Rev.* 19, 41–56.

Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., Vallance, B.A., 2018. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 39, 677–696.

Allam, S.N.E., 2014. Actions of the phytopharmakon Iberogast® in different regions of the gut. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Lehrstuhl für Humanbiologie. Technische Universität München. (Doktorarbeit).

Anderson, M.P., Sheppard, D.N., Berger, H.A., Welsh, M.J., 1992. Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 263, L1–L14.

Auerbach, L., 1862. Über einen Plexus myentericus, einen bisher unbekanntem ganglio-nervösen Apparat im Darmkanal der Wirbeltiere. Breslau E Morgenstern.

Bachmann, O., Seidler, U., 2011. News from the End of the Gut-How the Highly Segmental Pattern of Colonic HCO₃⁻ Transport Relates to Absorptive Function and Mucosal Integrity. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 794–802.

Banks, M.R., Farthing, M.J.G., Robberecht, P., Burleigh, D.E., 2005. Antisecretory actions of a novel vasoactive intestinal polypeptide (VIP) antagonist in human and rat small intestine. *Br. J. Pharmacol.* 144, 994–1001.

Barnes, N.M., Hales, T.G., Lummis, S.C.R., Peters, J.A., 2009. The 5-HT₃ receptor – the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 56, 273–284.

Barrett, K.E., 2008. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv. Physiol. Educ.* 32, 25–34.

Barrett, K.E., Keely, S.J., 2006. Integrative Physiology and Pathophysiology of Intestinal Electrolyte Transport, in: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Elsevier, pp. 1931–1951.

Barrett, K.E., Keely, S.J., 2000. Chloride Secretion by the Intestinal Epithelium: Molecular Basis and Regulatory Aspects. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 535–572.

Bayliss, W.M., Starling, E.H., 1899. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* 24, 99–143.

Bharucha, A.E., Camilleri, M., Zinsmeister, A.R., Hanson, R.B., 1997. Adrenergic modulation of human colonic motor and sensory function. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 273, G997–G1006.

Bhattacharjee, A.K., Pomponio, J.W., Evans, S.A., Pervitsky, D., Gordon, R.K., 2013. Discovery of subtype selective muscarinic receptor antagonists as alternatives to atropine using in silico pharmacophore modeling and virtual screening methods. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 2651–2662.

Blackshaw, L.A., Brookes, S.J.H., Grundy, D., Schemann, M., 2007. Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 1–19.

- Boland, M., 2016. Human digestion - a processing perspective: Human digestion - a processing perspective. *J. Sci. Food Agric.* 96, 2275–2283.
- Bouin, M., Plourde, V., Boivin, M., Riberdy, M., Lupien, F., Laganière, M., Verrier, P., Poitras, P., 2002. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: Sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 122, 1771–1777.
- Bueno, L., Fioramonti, J., Ruckebusch, Y., Frexinos, J., Coulom, P., 1980. Evaluation of colonic myoelectrical activity in health and functional disorders. *Gut* 21, 480–485.
- Bülbring, E., Crema, A., 1959. The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J. Physiol.* 146, 18–28.
- Chang, W., Kanda, H., Ikeda, R., Ling, J., DeBerry, J.J., Gu, J.G., 2016. Merkel disc is a serotonergic synapse in the epidermis for transmitting tactile signals in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E5491–E5500.
- Cooke, H.J., 2006. Neurotransmitters in Neuronal Reflexes Regulating Intestinal Secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915, 77–80.
- Cooke, H.J., 1998. “Enteric Tears”: Chloride Secretion and Its Neural Regulation. *Physiology* 13, 269–274.
- Cremonini, F., Houghton, L.A., Camilleri, M., Ferber, I., Fell, C., Cox, V., Castillo, E.J., Alpers, D.H., Dewit, O.E., Gray, E., Lea, R., Zinsmeister, A.R., Whorwell, P.J., 2005. Barostat testing of rectal sensation and compliance in humans: comparison of results across two centres and overall reproducibility. *Neurogastroenterol. Motil.* 17, 810–820.
- Day, J., King, B., Haque, S.M., Kellum, J.M., 2005. A nonneuronal 5-hydroxytryptamine receptor 3 induces chloride secretion in the rat distal colonic mucosa. *Am. J. Surg.* 190, 736–738.
- Dey, I., Lejeune, M., Chadee, K., 2006. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.* 149, 611–623.
- Diener, M., Rummel, W., 1990. Distension-induced secretion in the rat colon: mediation by prostaglandins and submucosal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 178, 47–57.
- Earnet, D.L., Hixson, L.J., Alberts, D.S., 1992. Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: Potential for cancer chemoprevention. *J. Cell. Biochem.* 50, 156–166.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A., 2000. Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* 25, 533–535.
- Fisher, D., 1999. Clinical pharmacology of neuromuscular blocking agents. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 56, S4–S9.
- Frieling, T., Rupprecht, C., Dobрева, G., Schemann, M., 1997. Differential Effects of Inflammatory Mediators on Ion Secretion in the Guinea-Pig Colon. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 118, 341–343.

- Frieling, T., Wood, J.D., Cooke, H.J., 1992. Submucosal reflexes: distension-evoked ion transport in the guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 263, G91–G96.
- Furness, J.B., 2006. *The enteric nervous system*. Blackwell Pub, Malden, Mass.
- Furness, J.B., Cottrell, J.J., Bravo, D.M., 2015. COMPARATIVE GUT PHYSIOLOGY SYMPOSIUM: Comparative physiology of digestion¹. *J. Anim. Sci.* 93, 485–491.
- Gadsby, D.C., Nairn, A.C., 1999. Control of CFTR Channel Gating by Phosphorylation and Nucleotide Hydrolysis. *Physiol. Rev.* 79, S77–S107.
- Garcia, M.A.S., Yang, N., Quinton, P.M., 2009. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator–dependent bicarbonate secretion. *J. Clin. Invest.* 119, 2613–2622.
- Garty, H., 1994. Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na⁺ channels. *FASEB J.* 8, 522–528.
- Gauweiler, B., Weihe, E., Hartschuh, W., Yanaihara, N., 1988. Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. *Neurosci. Lett.* 89, 121–126.
- Gayer, C.P., Basson, M.D., 2009. The effects of mechanical forces on intestinal physiology and pathology. *Cell. Signal.* 21, 1237–1244.
- Gershon, M.D., 2004. Review article: serotonin receptors and transporters - roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 3–14.
- Gershon, M.D., 1999. The Enteric Nervous System: A Second Brain. *Hosp. Pract.* 34, 31–52.
- Golenhofen, K., Mandrek, K., 1991. Phasic and Tonic Contraction Processes in the Gastrointestinal Tract. *Dig. Dis.* 9, 341–346.
- Greenwood, B., Davison, J.S., 1987. The relationship between gastrointestinal motility and secretion. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 252, G1–G7.
- Greenwood, B., Palmer, J.M., 1996. Neural integration of jejunal motility and ion transport in nematode-infected ferrets. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 271, G48–G55.
- Gribble, F.M., Reimann, F., 2016. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 277–299.
- Grundy, D., Schemann, M., 2006. Enteric nervous system: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22, 102–110.
- Hammer, J., Phillips, S.F., Talley, N.J., Camilleri, M., 2007. Effect of a 5HT₃-antagonist (ondansetron) on rectal sensitivity and compliance in health and the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 7, 543–551.
- Hansen, M.B., 2003a. The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113.

- Hansen, M.B., 2003b. The Enteric Nervous System III: A Target for Pharmacological Treatment. *Pharmacol. Toxicol.* 93, 1–13.
- Hartzell, C., Putzier, I., Arreola, J., 2005. CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CHANNELS. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 719–758.
- Heitmann, P.T., Mohd Rosli, R., Maslen, L., Wiklendt, L., Kumar, R., Omari, T.I., Wattchow, D., Costa, M., Brookes, S.J., Dinning, P.G., 2021. High-resolution impedance manometry characterizes the functional role of distal colonic motility in gas transit. *Neurogastroenterol. Motil.*
- Hoyle, C.H., Burnstock, G., 1989. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J. Anat.* 166, 7–22.
- Huizinga, J.D., Chen, J.-H., 2021. The Pressure's on: Finding the Cause of Diverticula Formation. *Dig. Dis. Sci.* 66, 668–670.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A.A., 2002. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol. Rev.* 82, 503–568.
- Kasai, H., Aosaki, T., Fukuda, J., 1987. Presynaptic Ca-antagonist ω -conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci. Res.* 4, 228–235.
- Keller, J., Bassotti, G., Clarke, J., Dinning, P., Fox, M., Grover, M., Hellström, P.M., Ke, M., Layer, P., Malagelada, C., Parkman, H.P., Scott, S.M., Tack, J., Simren, M., Törnblom, H., Camilleri, M., 2018. Advances in the diagnosis and classification of gastric and intestinal motility disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 291–308.
- Kiela, P.R., Ghishan, F.K., 2016. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 30, 145–159.
- Kreutz, F., 2018. Eigenschaften mechanosensitiver Neurone des myenterischen und submukösen Plexus nach Deformation. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Lehrstuhl für Humanbiologie. Technische Universität München. (Doktorarbeit).
- Krueger, D., Gruber, L., Buhner, S., Zeller, F., Langer, R., Seidl, S., Michel, K., Schemann, M., 2009. The multi-herbal drug STW 5 (Iberogast[®]) has prosecretory action in the human intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 1203-e110.
- Krueger, D., Michel, K., Zeller, F., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Slotta-Huspenina, J., Schemann, M., 2016. Neural influences on human intestinal epithelium *in vitro*. *J. Physiol.* 594, 357–372.
- Krüger, D., 2010. Regulation sekretorischer Aktivität im Humandarm *in vitro*. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Lehrstuhl für Humanbiologie. Technische Universität München. (Doktorarbeit).
- Kubota, K., Mase, A., Matsushima, H., Fujitsuka, N., Yamamoto, M., Morine, Y., Taketomi, A., Kono, T., Shimada, M., 2019. Daikenchuto, a traditional Japanese herbal medicine, promotes colonic transit by inducing a propulsive movement pattern. *Neurogastroenterol. Motil.* 31.
- Kunze, W.A.A., Clerc, N., Bertrand, P.P., Furness, J.B., 1999. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *J. Physiol.* 517, 547–561.

- Kwak, J.M., Babygirija, R., Gribovskaja-Rupp, I., Takahashi, T., Yamato, S., Ludwig, K., 2013. Regional Difference in Colonic Motility Response to Electrical Field Stimulation in Guinea Pig. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 19, 192–203.
- Lacy, B.E., Levenick, J.M., Crowell, M.D., 2012. Linaclotide in the management of gastrointestinal tract disorders. *Drugs Today* 48, 197.
- Lee, C.H., Ruben, P.C., 2008. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels* 2, 407–412.
- Lin, A.Y., Du, P., Dinning, P.G., Arkwright, J.W., Kamp, J.P., Cheng, L.K., Bissett, I.P., O'Grady, G., 2017. High-resolution anatomic correlation of cyclic motor patterns in the human colon: Evidence of a rectosigmoid brake. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G508–G515.
- Lipecka, J., Bali, M., Thomas, A., Fanen, P., Edelman, A., Fritsch, J., 2002. Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C805–816.
- Lüderitz, C., 1889. Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung der Darmperistaltik.
- Mall, M., Bleich, M., Schürlein, M., Kühr, J., Seydewitz, H.H., Brandis, M., Greger, R., Kunzelmann, K., 1998. Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am. J. Physiol.* 275, G1274–1281.
- Mazzuoli, G., Schemann, M., 2009. Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum: Mechanosensitive enteric neurons. *J. Physiol.* 587, 4681–4694.
- Mazzuoli-Weber, G., Schemann, M., 2015. Mechanosensitivity in the enteric nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
- Meissner, G., 1857. Ueber die Nerven der Darmwand.
- Michel, K., Krüger, D., Schäuffele, S., Zeller, F., Demir, I.E., Theisen, J., Schemann, M., 2021. Fast synaptic excitatory neurotransmission in the human submucosal plexus. *Neurogastroenterol. Motil.* 33.
- Michel, K., Schemann, M., 2020. Ussing Chamber Pressure Pump.
- Michel, K., Zeller, F., Langer, R., Nekarda, H., Kruger, D., Dover, T.J., Brady, C.A., Barnes, N.M., Schemann, M., 2005. Serotonin Excites Neurons in the Human Submucous Plexus via 5-HT₃ Receptors. *Gastroenterology* 128, 1317–1326.
- Naliboff, B.D., Munakata, J., Fullerton, S., Gracely, R.H., Kodner, A., Harraf, F., Mayer, E.A., 1997. Evidence for two distinct perceptual alterations in irritable bowel syndrome. *Gut* 41, 505–512.
- Narahashi, T., 2008. Tetrodotoxin -A brief history-. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 84, 147–154.
- Nilius, B., Droogmans, G., 2003. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol. Scand.* 177, 119–147.

- Nishida, M., Ishikawa, T., Saiki, S., Sunggip, C., Aritomi, S., Harada, E., Kuwahara, K., Hirano, K., Mori, Y., Kim-Mitsuyama, S., 2013. Voltage-dependent N-type Ca²⁺ channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 210–216.
- Olivera, B.M., Rivier, J., Scott, J.K., Hillyard, D.R., Cruz, L.J., 1991. Conotoxins. *J. Biol. Chem.* 266, 22067–22070.
- Paone, P., Cani, P.D., 2020. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 69, 2232–2243.
- Pervez, M., Ratcliffe, E., Parsons, S.P., Chen, J., Huizinga, J.D., 2020. The cyclic motor patterns in the human colon. *Neurogastroenterol. Motil.* 32.
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153.
- Sadahiro, S., Ohmura, T., Yamada, Y., Saito, T., Taki, Y., 1992. Analysis of length and surface area of each segment of the large intestine according to age, sex and physique. *Surg. Radiol. Anat.* 14, 251–257.
- Saint-Criq, V., Gray, M.A., 2017. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 93–115.
- Sandle, G.I., 1998. Salt and water absorption in the human colon: a modern appraisal. *Gut* 43, 294–299.
- Sariban-Sohraby, S., Benos, D.J., 1986. The amiloride-sensitive sodium channel. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 250, C175–C190.
- Schemann, M., Mai, G., Costa, M., Enck, P., 2021. Translating the seminal findings of Carl Lüderitz: A description in English of his extraordinary studies of gastrointestinal motility accompanied by a historical view of peristalsis. *Neurogastroenterol. Motil.* 33.
- Schemann, M., Michel, K., Peters, S., Bischoff, S.C., Neunlist, M., 2002. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G919–G925.
- Schemann, M., Neunlist, M., 2004. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 55–59.
- Schüle, W., 1925. Die Gasgesetze von Boyle (Mariotte) und von Gay-Lussac und das vereinigte Boyle-Gay-Lussacsche Gesetz, in: *Leitfaden der Technischen Wärmemechanik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 10–15.
- Schulzke, J.D., Fromm, M., Hegel, U., Riecken, E.O., 1989. Ion transport and enteric nervous system (ENS) in rat rectal colon: Mechanical stretch causes electrogenic Cl⁻ secretion via Plexus Meissner and amiloride-sensitive electrogenic Na⁺ absorption is not affected by intramural neurons. *Pflügers Arch.* 414, 216–221.
- Schulzke, J.D., Riecken, E.O., Fromm, M., 1995. Distension-induced electrogenic Cl⁻ secretion is mediated via VIP-ergic neurons in rat rectal colon. *Am. J. Physiol.* 268, G725-731.

- Thiagarajah, J.R., Yildiz, H., Carlson, T., Thomas, A.R., Steiger, C., Pieretti, A., Zukerberg, L.R., Carrier, R.L., Goldstein, A.M., 2014. Altered Goblet Cell Differentiation and Surface Mucus Properties in Hirschsprung Disease. *PLoS ONE* 9, e99944.
- Ussing, H.H., Zerahn, K., 1951. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiol. Scand.* 23, 110–127.
- Verkman, A.S., Galiotta, L.J.V., 2009. Chloride channels as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 153–171.
- Weber, E., Neunlist, M., Schemann, M., Frieling, T., 2001. Neural components of distension-evoked secretory responses in the guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* 536, 741–751.
- Wiesner, W., Mortelé, K.J., Ji, H., Ros, P.R., 2002. Normal Colonic Wall Thickness at CT and Its Relation to Colonic Distension: *J. Comput. Assist. Tomogr.* 26, 102–106.
- Wijnen, B., Hunt, E.J., Anzalone, G.C., Pearce, J.M., 2014. Open-Source Syringe Pump Library. *PLoS ONE* 9, e107216.
- Xue, J., Askwith, C., Javed, N.H., Cooke, H.J., 2007. Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 133, 55–63.
- Yang, N., Liu, S.M., Zheng, L.F., Ji, T., Li, Y., Mi, X.L., Xue, H., Ren, W., Xu, J.D., Zhang, X.H., Li, L.S., Zhang, Y., Zhu, J.X., 2010. Activation of submucosal 5-HT₃ receptors elicits a somatostatin-dependent inhibition of ion secretion in rat colon. *Br. J. Pharmacol.* 159, 1623–1625.
- Zhao, J., Liao, D., Yang, J., Gregersen, H., 2010. Biomechanical remodelling of obstructed guinea pig jejunum. *J. Biomech.* 43, 1322–1329.
- Zulkifli, M.H., Viswenaden, P., Jasamai, M., Azmi, N., Yaakob, N.S., 2019. Potential roles of 5-HT₃ receptor (5-HT₃R) antagonists in modulating the effects of nicotine. *Biomed. Pharmacother.* 112, 108630.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schnittbild durch die Darmwand (C) Simon Brooks.	9
Abb. 2: Schematische Darstellung von Epithelzellen mit wichtigen Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren.....	14
Abb. 3: Verteilung der Gewebe und Patienten.	20
Abb. 4: Geschlechterverteilung der Patienten nach Region	21
Abb. 5: Schema der Präparation der Gewebeproben	22
Abb. 6: Übersicht der selbstgebauten Gewebehalter..	28
Abb. 7: Schema der Ussingkammer.....	29
Abb. 8: Pumpe zur Druckapplikation an der Ussingkammer	33
Abb. 9: Beispielgraph einer serosalen Druckstimulation mit 20 mmHg im Colon sigmoideum.	40
Abb. 10: Modell der Kugelkalotte	43
Abb. 11: Änderung des Kurzschlussstroms I_{sc} ($\mu A/cm^2$) bei dreifach repetitiven serosalen 20 mmHg Druck-Stimulationen des Diaphragmas	44
Abb. 12: Seitliche Ansichten der 1,08 cm^2 Gewebehalter. Ausdehnung.	45
Abb. 13: Dehnungsinduzierte Sekretionsantworten ($\mu A/cm^2$) bei dreifach repetitiver 20 mmHg Rampendruckstimulationen.	47
Abb. 14: Beispielgraphen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort zweier Gewebe bei dreifach repetitiver serosaler 20 mmHg Rampenstimulation.	47
Abb. 15: Vergleiche der Messflächen von 0,5 cm^2 (klein) und 1,08 cm^2 (groß).	48
Abb. 16: Beispielgraphen der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei 20 mmHg serosalem Rampendruck bei maximal vorgespanntem und Gewebe ohne Vorspannung	50
Abb. 17: Vergleich der dehnungsinduzierten sowie der elektrisch stimulierten Sekretionsantwort bei unterschiedlicher Gewebevorspannung.	51
Abb. 18: Vergleiche unterschiedlicher Pumpengeschwindigkeiten bei 10 und 20 mmHg	52
Abb. 19: Vergleiche von Mucosa/Submucosa- und Ganzwand-Präparaten bei serosal 20 mmHg.....	54
Abb. 20: Die serosal mit 20 mmHg Rampendruckinduzierte Sekretionsantwort ($\mu A/cm^2$) und Dauer der Dehnungsantwort (s) der Gewebe mit Netz oder Filter.....	56
Abb. 21: 20 mmHg serosal dehnungsinduzierte Sekretionsantwort ($\mu A/cm^2$) in Versuchskrebslösung mit hohem KCl Gehalt	57
Abb. 22: Vergleiche der dehnungsinduzierten Sekretion in $\mu A/cm^2$ bei unterschiedlichen Pharmaka.	60
Abb. 23: Korrelation der Mediane der Sekretionsantworten ($\mu A/cm^2$) mit aufsteigenden Rampendrücken von 2-60 mmHg in gemischten Regionen des Dickdarmes	61
Abb. 24: Vergleiche der dreifach repetitiven 20 mmHg serosalen Druckstimulation je Region	63
Abb. 25: Vergleiche der serosal mit 20 mmHg dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei schneller (500 $\mu l/s$) sowie langsamer (50 $\mu l/s$) Druckapplikation in gemischten Regionen	64
Abb. 26: Vergleich der 20 mmHg serosal und mucosal rampenstimulierten Gewebe n	66
Abb. 27: Vergleich der dehnungsinduzierten Sekretionsantworten ($\mu A/cm^2$) der serosalen gegen die mucosalen Druckstimulationen von 20 mmHg-Rampe je Region.	67
Abb. 28: Vergleiche des benötigten Dehnungsvolumens (μl) der mit 20 mmHg-Rampe dehnungsstimulierten Gewebe bei serosalen und mucosalen Stimulationen je Region.....	68
Abb. 29: Vergleiche der Dauer (s) der mit 20 mmHg-Rampe dehnungsstimulierten Gewebe	68
Abb. 30: Vergleiche der serosalen und mucosalen Stimulation mit 20 mmHg Rampendruck	69
Abb. 31: Vergleiche der 20 mmHg-Rampen dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei serosaler und mucosaler Stimulation	71
Abb. 32: Vergleiche der 20 mmHg dehnungsinduzierten Sekretionsantwort in $\mu A/cm^2$ bei serosal und mucosal gepulster Stimulation	72
Abb. 33: Vergleich der dehnungsinduzierten Sekretionsantworten in $\mu A/cm^2$ der serosal und mucosal gepulsten Stimulationen.....	73
Abb. 34: Vergleiche der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort der 20 mmHg serosal wie auch mucosal gepulst stimulierten Geweben	74

Abb. 35: Vergleiche von Sekretionsantworten in Standard Versuchskrebslösung zu Chlorid (Cl ⁻)-freier oder Chlorid/Bikarbonat (Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻)-freier Versuchslösung.	76
Abb. 36: Vergleiche der serosalen Druckapplikation von 20 mmHg Rampe bei Gewebe ohne Netz oder Filter, Gewebe mit Netz und Gewebe mit Filter.....	78
Abb. 37: Vergleiche der dehnungsinduzierten Sekretionsantwort bei Applikation verschiedener Pharmaka in gemischten Dickdarmregionen	81
Abb. 38: Vergleiche der Prostaglandin induzierten Sekretionsantwort mit und ohne Einfluss durch TTX	83
Abb. 39: Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und Gewebewiderstand.....	84
Abb. 40: Es gab keinen Zusammenhang zwischen Geschlecht der Patienten (A) oder zugrunde liegender Erkrankung (B).....	85
Abb. 41: Vergleiche der 20 mmHg dehnungsinduzierten Sekretionsantworten im Ileum.....	86

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosen der Patienten der verwendeten Humanproben	20
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien für Präparation und Experimente	23
Tabelle 3: Verwendete Software und Hersteller	25
Tabelle 4: Zusammensetzung der HEPES-Lösung	25
Tabelle 5: Zusammensetzung der Präparationskreb- und Versuchskrebslösung.....	25
Tabelle 6: Zusammensetzung der Chlorid und Bikarbonat-freien Versuchskrebslösung	26
Tabelle 7: Zusammensetzung der Chlorid-freien Versuchskrebslösung	26
Tabelle 8: Zusammensetzung für die Herstellung der 100 mM KCl Krebs Lösung	27
Tabelle 9: Zusammensetzung der 3 M KCl	27
Tabelle 10: Humangewebe-Proben.....	113
Tabelle 11: Meerschweinchen Versuchstiere.....	117
Tabelle 12: Meerschweinchen repetitive Stimulationen dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	118
Tabelle 13: Meerschweinchen kombinierte Versuche, Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	119
Tabelle 14: Meerschweinchen Dehnungsvolumen in μl	119
Tabelle 15: Meerschweinchen weitere pharmakologische Untersuchungen	119
Tabelle 16: Human Threshold Versuche dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2 2-60 mmHg Rampe	120
Tabelle 17: Human dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ repetitiv	120
Tabelle 18: Human Dehnungsvolumen in μl repetitiv 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe serosal	120
Tabelle 19: Human schnell gegen langsam dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	120
Tabelle 20: Human serosal vs. mucosal dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	120
Tabelle 21: Human serosal vs. mucosale Stimulationen Dehnungsvolumen in μl 1,08 cm^2	120
Tabelle 22: Human serosal vs. mucosale Stimulationen Dauer in s 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe	121
Tabelle 23: Human serosal vs. TTX dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	121
Tabelle 24: Human mucosal vs. TTX dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	121
Tabelle 25: Human serosal- und mucosal gepulste dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	121
Tabelle 26: Human serosal gepulst vs. TTX 1 μM dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	121
Tabelle 27: Human mucosal gepulst vs. TTX 1 μM dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	121
Tabelle 28: Human Chlorid-frei dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2	122
Tabelle 29: Human 10, 20 und 60 mmHg dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	122
Tabelle 30: Human ohne Netz/Filter, Netz, Filter dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	122
Tabelle 31: Human ohne Netz/Filter, Netz, Filter Dehnungsvolumen in μl	122
Tabelle 32: Human PGE ₂ und PGE ₂ in TTX Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	122
Tabelle 33: Human Mediatoren-Versuche dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	122
Tabelle 34: Human Alter, Widerstand 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe.....	122
Tabelle 35: Humangewebe Männer gegen Frauen dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	123
Tabelle 36: Humangewebe nach Diagnosen gruppiert, dehnungsinduzierte Sekretionsantwort	123

Tabelle 37: Meerschweinchen statistische Tests	123
Tabelle 38: Humangewebe statistische Tests.....	124

8. Anhang

8.1. Tabellen

Tabelle 10: Humangewebe-Proben, (CA= Karzinom, TU=Tumor)

OP Datum	Region	Diagnose	Geboren	Geschl.	Pat-Nr.
07.06.2018	Asc.	Colon CA	22.10.1934	f	MD992
19.06.2018	Ileum	Ileozökalresektion CA	15.01.1972	f	MD997
19.06.2018	Desc.	Sig. CA	12.08.1941	m	FS84024145
26.06.2018	Sig.	Sig. CA	26.04.1945	f	FS84023509
27.06.2018	Ileum	Ovarial CA	26.02.1943	f	FS84025805
28.06.2018	Sig.	nicht stenosierendes Rektum CA	01.01.1955	f	FS84020381
04.07.2018	Asc.	Anus praeter	24.07.1947	m	MD999
10.07.2018	Ileum	Dickdarm- Resektion	25.09.1957	f	FSY
31.07.2018	Desc.	Ano-rektales Melanom	20.08.1942	f	FS84031970
08.08.2018	Ileum	Rektum CA	16.04.1963	m	FS84030307
09.08.2018	Trans.	Asc. CA	26.08.1948	f	FS84033390
22.08.2018	Asc.	Colon CA	23.09.1964	f	MD1001
04.09.2018	Ileum	Pankreas CA	20.04.1941	f	MD1002
11.09.2018	Sig.	Sig. Divertikulose	14.02.1970	f	MD1004
11.09.2018	Ileum	distal Ileumstenose bei Morbus Crohn	21,12,1950	f	MD1003
11.09.2018	Asc.	distal Ileumstenose bei Morbus Crohn	21.12.1950	f	MD1003
12.09.2018	Sig.	Divertikulose	24.03.1965	f	MD1005
19.09.2018	Duodenum	Distales extrahepatisches Gallengangs CA	31.05.1938	f	MD1007
18.10.2018	Asc.	Polyp	11.05.1953	m	FS84040461
07.11.2018	Sig.	Divertikulitis	12.07.1952	f	ED118462882
12.11.2018	Sig.	Sig. CA	29.05.1938	f	ED101081
12.11.2018	Duodenum	AEGII (CA)	28.06.1936	m	MD1012
13.11.2018	Ileum	Dickdarm Resektion	14.09.1932	f	FSX
19.11.2018	Sig.	Divertikulitis	02.03.1951	f	ED118481704
20.11.2018	Desc.	Colon CA	28.09.1968	m	FS8406565

Tabellen

26.11.2018	Sig.	Rektum CA	05.04.1964	m	ED118498240
26.11.2018	Ileum	Asc. CA	28.10.1938	f	ED118496313
28.11.2018	Trans.	Polyp rechte Flexur	26.06.1959	f	FS84046292
13.12.2018	Asc.	Colon CA	17.12.1933	f	FS840051669
17.12.2018	Sig.	Sig. Divertikulitis	01.03.1956	m	ED118531493
09.01.2019	Trans.	Trans. CA	02.01.1942	f	ED119007763
09.01.2019	Asc.	Colon CA	05.11.1931	f	ED119004551
10.01.2019	Desc.	laparoskopische Sig. Resektion	03.03.1962	m	FS1306161
16.01.2019	Sig.	Sig. Divertikulitis	08.08.1953	f	MD1024
22.01.2019	Sig.	Sig. CA	16.10.1953	m	ED119028280
31.01.2019	Trans.	Adeno CA Colon	09.06.1938	f	FS85005028
06.02.2019	Colon	Sig. Divertikulitis	12.06.1955	f	MD1027
07.02.2019	Sig.	CA oberes Rektum	14.05.1950	m	FS85004888
07.02.2019	Sig.	Divertikulitis	24.09.1973	m	FS85004217
11.02.2019	Asc.	CA Colon	25.09.1938	f	ED119053790
13.02.2019	Sig.	Divertikulitis	25.06.1981	m	ED119003105
01.04.2019	Asc.	muzinöses Appendix CA	08.04.1937	f	MD1034
08.04.2019	Desc.	Colon CA	22.10.1943	f	ED119155142
09.04.2019	Rektum	Rektum CA	02.06.1969	f	MD1036
10.04.2019	Caecum	Bronchial CA Dünndarm Metastasen	14.08.1960	f	MD1037
17.04.2019	Sig.	Sig. CA	28.06.1958	m	MD1038
07.05.2019	Desc.	Rektum CA	09.03.1966	m	FS85016833
07.05.2019	Asc.	Colon CA	16.05.1950	f	MD1040
13.05.2019	Desc.	Sig. CA	20.02.1942	f	FS85020149
13.06.2019	Asc.	Divertikulitis	06.04.1948	m	MD1042
02.07.2019	Sig.	Colorectales Adeno CA	26.08.1969	f	FS85026756
16.07.2019	Trans.	Coecum TU	25.01.1944	m	FS85027578
20.08.2019	Sig.	Sig. Polypen	05.11.1963	m	FS85035009
19.09.2019	Sig.	Steno. Sig. Adeno CA	10.01.1936	m	MD1045
23.09.2019	Asc.	Colon CA	15.04.1947	m	MD1046
26.09.2019	Desc./Sig.	Stenosierende Sig. Divertikulitis	08.04.1961	m	FS85039630
08.10.2019	Sig.	Sig. CA	18.11.1968	f	FS85042308
09.10.2019	Sig.	Sig. CA	03.01.1985	f	FS85041831

Tabellen

15.10.2019	Sig.	CA rektosigmoidaler Übergang	15.06.1935	m	FS85043379
15.10.2019	Sig.	Sig. Divertikulitis	04.03.1951	m	MD1049
29.10.2019	Asc.	Colon CA	03.08.1976	m	MD1051
30.10.2019	Desc.	Rektum CA	03.04.1970	f	FS85037923
11.11.2019	Trans.	Trans. CA	16.10.1949	m	FS85047438
13.11.2019	Sig.	Sig. Divertikulitis	10.11.1966	f	MD1053
03.12.2019	Jejunum	Gastrischer CA	15.11.1963	f	MD1056
11.12.2019	Ileum	Ovarial CA, Darm-Tumor	29.03.1954	f	FS31653
11.12.2019	Trans.	CA	21.01.1930	f	ED119522927
11.12.2019	Trans.	CA in Asc.	01.07.1948	f	FS76466
11.12.2019	Asc.	CA	03.04.1955	f	ED119526850
16.12.2019	Asc.	CA	02.06.1936	f	ED119528240
17.12.2019	Asc.	CA	14.08.1959	.m	ED119540321
07.01.2020	Sig.	Colon CA	19.02.1944	m	MD1058
08.01.2020	Trans.	Colon CA	24.09.1939	f	ED120201867
13.01.2020	Trans.	CA	28.07.1955	m	ED120218034
30.01.2020	Sig.	Divertikulitis	01.12.1951	f	ED120205633
06.02.2020	Sig.	Sig. CA	18.10.1960	m	MD1060
06.02.2020	Ileum	Colon CA	08.06.1946	m	ED120249053
14.02.2020	Trans.	Neubildung ohne Vorbehandlung	07.06.1969	f	FS86004591
17.02.2020	Sig.	Divertikulitis	02.05.1951	m	ED120268970
20.02.2020	Sig.	Divertikulitis	05.12.1968	m	ED120269437
20.02.2020	Sig.	Divertikulitis	10.02.1982	m	MD1064
20.02.2020	Trans.	Dickdarm Polyp	19.09.1954	m	FS86005714
10.03.2020	Sig.	Colitis	06.02.1985	m	MD1067
11.03.2020	Ileum	Adeno CA	13.11.1970	f	MD09661230528
27.04.2020	Sig.	Sig. CA	10.05.1945	m	MD1070
30.04.2020	Rektum	Sig. CA	13.05.1957	f	FS86013747
05.05.2020	Desc.	Sig. Divertikulitis	31.01.1964	f	FS86014642
07.05.2020	Asc.	Darmentleerungsstörung	24.04.1963	f	MD1072
14.05.2020	Desc.	Colon CA	12.09.1948	f	FS86014936
20.05.2020	Sig.	Divertikulitis	12.10.1962	f	ED120349799
28.05.2020	Sig.	Sig. Divertikulitis	31.01.1979	m	FS86015847

Tabellen

04.06.2020	Desc.	Sig. CA	26.02.1939	m	FS86016136
15.06.2020	Asc.	Colon CA	13.04.1940	f	MD1074
16.06.2020	Sig.	Divertikulitis	16.05.1948	f	ED120418920
01.07.2020	Rektum	Ulcerative Colitis	01.09.1982	f	MD05662043573
02.07.2020	Sig.	Sig. CA	16.04.1943	m	MD1077
13.07.2020	Trans.	Polyp Asc.	29.08.1964	f	FS86021864
16.07.2020	Asc.	CA	24.02.1929	f	ED120461931
27.07.2020	Desc.	Tiefes Rektum CA	17.12.1955	m	FS86016851
29.07.2020	Sig.	CA	31.10.1938	m	ES120489224
17.08.2020	Sig.	Rektum CA	15.05.1949	m	MD1079
19.08.2020	Sig.	Colon CA	13.09.1957	f	MD09662544327
25.08.2020	Sig.	CA	10.06.1945	m	MD09662594670
07.09.2020	Sig.	Ulcerative colitis	18.10.1980	f	MD1082
16.09.2020	Sig.	Divertikulitis	08.07.1974	f	ED120544080
29.09.2020	Trans.	Trans. CA	08.02.1939	f	FS86029535
01.10.2020	Sig.	Tiefes Rektum CA	14.05.1934	f	FS86028575
08.10.2020	Sig.	Hepatisches metastasierendes Colon CA	08.07.1943	m	MD1084
12.10.2020	Sig.	Ulcerative Colitis	12.07.1939	m	MD1085
22.10.2020	Sig.	Sig. Divertikulitis	07.04.1977	m	MD1086
29.10.2020	Sig.	Sig. Volvulus	20.10.1959	m	FS86032994
29.10.2020	Asc.	Colon CA	21.04.1955	m	ED120625268
02.12.2020	Sig.	Sig. CA	26.11.1932	m	FS86036561
14.01.2021	Sig.	Sig. Divertikulitis	26.06.1982	f	FS193954
11.02.2021	Desc.	Sig. CA	11.12.1966	f	FS87003898
25.02.2021	Asc.	Dickdarm- Resektion	16.12.1938	f	FS87005193
03.03.2021	Asc.	Sig. CA	27.02.1956	m	FS87006059
08.04.2021	Trans.	Coecum CA	21.01.1943	f	FS87006869
15.04.2021	Sig.	rez. Sig. Volvus elongatum	21.02.1982	f	FS87007723
29.04.2021	Trans.	Colon CA	07.04.1950	m	MD1088
05.05.2021	Sig.	Sig. Divertikulitis	23.06.1982	f	ED121135329
11.05.2021	Sig.	Divertikulitis	09.03.1964	f	ED121155109
12.05.2021	Trans.	Ascendens CA	30.10.1939	f	FS8703648

Tabelle 11: Meerschweinchen Versuchstiere

Datum	Gewicht in g
23.07.2018	325
25.07.2018	335
22.08.2018	330
04.09.2018	300
18.09.2018	337
25.09.2018	330
18.10.2018	334
31.10.2018	332
27.03.2019	357
03.04.2019	366
08.04.2019	238
10.04.2019	260
15.04.2019	290
17.04.2019	300
09.05.2019	385
14.05.2019	307
16.05.2019	350
23.05.2019	416
28.05.2019	235
06.06.2019	320
13.06.2019	364
27.06.2019	415
04.07.2019	330
09.07.2019	360
11.07.2019	335
16.07.2019	390
22.08.2019	260
27.08.2019	290
03.09.2019	245
10.09.2019	395
17.09.2019	235
19.09.2019	246
24.09.2019	290
26.09.2019	225
08.10.2019	320
15.10.2019	270
22.10.2019	244
24.10.2019	244
05.11.2019	304
07.11.2019	250
12.11.2019	300
14.11.2019	290
03.12.2019	370
05.12.2019	375
10.12.2019	423

11.12.2019	593
12.12.2019	582
17.12.2019	548
19.12.2019	660
16.01.2020	250
28.01.2020	340
30.01.2020	334
04.02.2020	290
06.02.2020	290
11.02.2020	325
20.02.2020	250
27.02.2020	305
10.03.2020	390
12.03.2020	320
05.05.2020	680
07.05.2020	729
03.09.2020	475
17.09.2020	640
24.09.2020	610
29.09.2020	330
01.10.2020	305
06.10.2020	380
07.10.2020	380
13.10.2020	307
15.10.2020	297
22.10.2020	373
27.10.2020	257
29.10.2020	270
17.11.2020	398
05.11.2020	304
03.12.2020	358
08.12.2020	339
10.12.2020	303
14.12.2020	340
15.12.2020	349

Tabelle 12: Meerschweinchen repetitive Stimulationen dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

n=	Päparat	1. Stimulation	2. Stimulation	3. Stimulation
7/7/5	Diaphragma 0,5 cm ²	0,0(0,0/4,9)	0,3(0,0/1,6)	1,0(0,2/7,9)
22/22/22	Mucosa/Subm. 0,5 cm ²	57,5(22,2/110,2)	36,6(15,6/84,2)	39,6(23,3/72,5)
8/8/8	Mucosa/Subm. 1,08 cm ²	54,1(24,6/232,3)	48,9(12,9/184,0)	65,0(15,2/188,9)
8/8/8	Ganzwand 0,5 cm ²	35,1(9,0/48,4)	29,6(7,5/43,4)	20,3(11,4/22,3)
5/5/5	Ganzwand 1,08 cm ²	160,9(7,8/295,7)	93,8(5,1/220,7)	42,1(5,0/144,3)

Tabelle 13: Meerschweinchen kombinierte Versuche, Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

n=	Päparat	Protokoll	Kontrolle	TTX 1 μM
13/13	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Maximale Vorspannung	34,9(7,9/123,9)	17,9(7,4/23,6)
18/18	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Ohne Vorspannung	70,1(37,0/114,0)	33,1(20,1/51,9)
11	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	EFS Maximale Vorspannung	131,9(74,8/310,6)	
14	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	EFS ohne Vorspannung	304,8(103,0/352,2)	
8/8	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Mittel 200 $\mu\text{l/s}$ 10 mmHg	27,2(14,2/82,6)	16,8(9,8/39,7)
9/9	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Schnell 500 $\mu\text{l/s}$ 10 mmHg	9,8(6,0/62,2)	8,0(3,5/13,3)
28/28	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Mittel 200 $\mu\text{l/s}$ 20 mmHg	39,6(20,3/74,1)	30,3(16,9/49,1)
7/7	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Schnell 500 $\mu\text{l/s}$ 20mmHg	25,9(14,7/68,2)	8,6(7,6/15,5)
8/8	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Langsam 50 $\mu\text{l/s}$ 20 mmHg	52,4(17,8/116,7)	34,0(23,0/48,9)
28/28	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	Rampe 20 mmHg	39,6(20,3/74,1)	30,3(16,9/49,1)
10/10	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Rampe 20 mmHg	65,0(8,2/160,4)	72,2(8,6/133,4)
8/8	Ganzwand beide Gr.	Rampe 20 mmHg	32,4(10,4/96,7)	12,2(8,2/17,8)
5/5	Ganzwand 1,08 cm^2	Rampe 20 mmHg	42,1(5,0/144,3)	11,4 (6,6/20,5)
8/8	Ganzwand beide Gr.	TTX serosal	32,4(10,4/96,7)	12,2(8,2/17,8)
4/4	Ganzwand 0,5 cm^2	TTX mucosal	16,7(11,4/21,0)	8,9(6,9/58,8)
24	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Ohne Netz/Filter	48,5(32,2/75,2)	
27	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Netz	30,8(19,2/126,7)	
9	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Filter	8,4(4,8/15,8)	
6/6	Mucosa/Subm. 0,5 cm^2	10 mM KCL	35,0(14,1/57,3)	15,7(6,7/49,3)

Tabelle 14: Meerschweinchen Dehnungsvolumen in μl

n=	Päparat	Protokoll	Kontrolle
24	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Ohne Netz/Filter	221,2(135,3/281,5)
27	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Netz	122,7(63,9/165,4)
9	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Filter	102,4(58,1/121,7)

Tabelle 15: Meerschweinchen weitere pharmakologische Untersuchungen, dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

n=	Päparat	Protokoll	Kontrolle	Pharmakon
5/5	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Gadolinium 100 μM	47,2(35,2/61,9)	72,9(59,3/89,6)
6/6	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Gadolinium 100 μM + Netz	20,8(14,5/156,4)	47,3(3,6/137,3)
13/13	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Neostigmin 1 μM	52,2(33,4/91,0)	181,8(90,0/236,1)
11/11	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Neostigmin 1 μM + Netz	58,4(19,6/176,4)	255,9(103,0/278,1)
6/6	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Piroxicam 10 μM	36,7(9,9/217,6)	17,3(3,4/51,5)
10/10	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Piroxicam 10 μM + Netz	37,8(22,0/104,4)	7,0(2,0/45,6)
9/9	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	Piroxicam 10 μM + Filter	8,4(4,8/15,8)	3,8(2,2/6,3)
6/6	Mucosa/Subm. Beide Gr.	ω -Conotoxin GVIA 500 nM	47,5(33,9/90,4)	74,2(19,4/144,8)
4/4	Mucosa/Subm. 1,08 cm^2	ω -Conotoxin GVIA 500 nM	47,5(26,0/116,2)	102,7(29,4/218,8)

**Tabelle 16. Human Threshold Versuche dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$
1,08 cm^2 2-60 mmHg Rampe**

n=	Druck [mmHg]	Sekretionsantwort [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	Dehnungsvolumen [μl]
23	2	0,6(0,0/2,1)	17,3(1,2/25,1)
23	5	1,2(0,0/2,6)	24,4(0,0/71,6)
23	10	4,7(2,8/8,7)	176,5(110,0/188,9)
22	15	9,7(5,3/14,3)	237,3(203,0/276,7)
21	20	18,7(10,6/25,5)	290,0(266,7/327,5)
9	40	36,9(18,3/105,1)	505,6(392,1/685,5)
8	60	58,7(14,8/107,5)	702,6(497,3/909,4)

**Tabelle 17: Human dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ repetitiv 1,08 cm^2
20 mmHg Rampe serosal**

n=	Region	1. Stimulation	2. Stimulation	3. Stimulation
8/8/8	Asc.	23,8(15,7/45,6)	22,9(13,8/27,6)	22,3(14,3/28,6)
6/6/6	Trans.	27,9(17,8/45,2)	27,2(14,9/45,3)	26,9(21,8/48,2)
8/8/8	Desc.	12,5(7,5/19,6)	9,2(4,8/10,9)	10,7(4,5/17,9)
8/8/8	Sig./Rect.	20,0(12,5/25,3)	18,1(10,2/20,5)	17,6(10,4/23,1)
5/5/5	Ileum	17,1(12,8/28,3)	18,7(10,6/28,5)	19,1(13,3/26,9)

Tabelle 18: Human Dehnungsvolumen in μl repetitiv 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe serosal

n=	Region	1. Stimulation	2. Stimulation	3. Stimulation
5/5/5	Asc.	97,7(23,6/178,5)	143,0(75,5/184,9)	141,3(70,4/162,9)
5/4/5	Trans.	253,1(89,6/382,1)	255,1(216,7/338,8)	256,7(156,2/405,0)
7/7/7	Desc.	199,8(114,2/205,9)	218,8(120,8/324,9)	182,9(116,7/291,9)
8/8/8	Sig./Rect.	143,3(66,2/225,3)	119,3(99,4/213,6)	77,8(74,3/138,5)

**Tabelle 19: Human schnell gegen langsam dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$
1,08 cm^2 20 mmHg**

n=	Protokoll	Kontrolle	TTX
7/7	schnell	5,5(4,8/9,6)	8,4(6,6/10,0)
5/5	langsam	11,9(8,0/19,8)	11,4(8,0/13,8)

**Tabelle 20: Human serosal vs. mucosal dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$
1,08 cm^2 20 mmHg Rampe**

n=	Region	serosal	mucosal
51/18	Asc.	24,8(14,6/35,1)	9,2(6,2/19,8)
45/16	Trans.	38,6(31,7/56,8)	20,3(6,8/31,5)
37/9	Desc.	13,5(6,9/22,3)	8,7(4,2/13,9)
106/29	Sig./Rect.	16,2(9,8/27,0)	7,1(2,9/10,6)
22/7	Ileum	14,8(12,2/21,8)	11,7(10,3/16,7)

**Tabelle 21: Human serosal vs. mucosale Stimulationen Dehnungsvolumen in μl 1,08 cm^2
20 mmHg Rampe**

n=	Region	serosal	mucosal
40/18	Asc.	170,1(118,6/214,3)	169,1(116,3/255,1)
44/16	Trans.	179,2(118,9/242,7)	167,1(89,4/238,2)
33/9	Desc.	179,8(122,9/228,5)	129,0(59,4/168,5)
99/29	Sig./Rect.	181,6(116,9/218,3)	168,6(100,3/225,9)

Tabelle 22: Human serosal vs. mucosale Stimulationen Dauer in s 1,08 cm² 20 mmHg Rampe

n=	Region	serosal	mucosal
40/18	Asc.	769,0(653,7/898,5)	788,5(632,5/1082,5)
44/16	Trans.	972,6(750,1/1105,0)	706,5(488,0/987,5)
33/9	Desc.	585,0(484,5/784,5)	538,0(277,0/780,5)
99/29	Sig./Rect.	680,0(513,0/884,0)	624,0(331,0/794,0)

Tabelle 23: Human serosal vs. TTX dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

n=	Region	Kontrolle	TTX
14/14	Asc.	22,0(12,3/28,4)	16,2(9,3/22,2)
6/6	Trans.	35,5(21,0/53,5)	34,9(19,2/44,3)
10/10	Desc.	12,9(7,6/18,9)	10,7(9,0/21,9)
19/19	Sig./Rect.	16,4(9,1/27,7)	15,3(12,3/21,5)
17/17	Ileum	14,0(10,8/22,6)	10,5(7,1/15,1)

Tabelle 24: Human mucosal vs. TTX dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm² 20 mmHg Rampe

n=	Region	Kontrolle	TTX
9/9	Asc.	15,6(6,3/23,3)	9,9(5,1/18,8)
6/6	Trans.	16,5(5,1/20,4)	11,0(5,4/19,1)
6/6	Desc.	8,1(6,4/14,9)	11,8(6,6/16,4)
12/12	Sig./Rect.	10,0(3,9/14,4)	7,2(2,9/11,1)
5/5	Ileum	11,2(7,8/14,5)	3,6(1,2/7,4)

Tabelle 25: Human serosal- und mucosal gepulste dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm² 20 mmHg

n=	Region	serosal	mucosal
8/8	Asc.	26,1(14,3/63,0)	10,4(3,2/18,0)
5/4	Trans.	31,9(11,7/54,8)	7,3(1,6/19,5)
6/5	Desc.	11,2(7,0/16,3)	4,5(2,4/12,2)
13/10	Sig./Rect.	14,4(6,5/22,8)	4,4(2,2/7,7)

Tabelle 26: Human serosal gepulst vs. TTX 1 μM dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm² 20 mmHg Rampe

n=	Region	Kontrolle	TTX
8/8	Asc.	26,8(15,2/50,9)	24,8(13,9/45,6)
5/5	Trans.	24,7(13,7/40,6)	21,2(12,7/35,1)
6/6	Desc.	9,0(7,1/19,5)	10,2(5,0/25,0)
13/13	Sig./Rect.	13,8(7,4/21,9)	16,4(8,4/26,9)

Tabelle 27: Human mucosal gepulst vs. TTX 1 μM dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm² 20 mmHg Rampe

n=	Region	Kontrolle	TTX
8/8	Asc.	9,5(2,9/14,3)	7,3(3,5/20,9)
4/4	Trans.	6,5(2,4/12,3)	9,2(3,5/15,0)
5/5	Desc.	5,9(2,5/13,8)	6,0(1,8/14,5)
9/9	Sig./Rect.	6,1(5,0/10,3)	7,2(5,5/14,7)

Tabelle 28: Human Chlorid-frei dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe

n=	Protokoll	1. Krebs	Cl-Frei	2. Krebs
23	Chlorid-frei	21,6(10,6/45,3)	7,8(3,2/12,5)	26,0(16,1/44,0)
25	Chlorid Bikarbonat-frei	23,9(11,1/31,6)	0,3(0,0/2,0)	13,7(9,7/21,8)

Tabelle 29: Human 10, 20 und 60 mmHg dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2 Rampe

n=	10 mmHg	20 mmHg	60 mmHg
26/26/11	4,9(2,6/8,8)	18,8(10,0/25,5)	69,9(29,1/119,2)

Tabelle 30: Human ohne Netz/Filter, Netz, Filter dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe

n=	Ohne Netz/Filter	Netz	Filter
106/34/13	20,1(11,2/30,8)	4,2(2,0/8,7)	0,9(0,0/2,4)

Tabelle 31: Human ohne Netz/Filter, Netz, Filter Dehnungsvolumen in μl 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe

n=	Ohne Netz/Filter	Netz	Filter
106/34/13	175,1(122,2/213,2)	54,2(14,6/102,3)	21,3(0,0/48,8)

Tabelle 32. Human PGE₂ und PGE₂ in TTX Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

n=	PGE ₂	PGE ₂ in TTX 1 μM
14/14	85,5(64,4/121,7)	87,6(47,1/107,6)

Tabelle 33: Human Mediatoren-Versuche dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe

n=	Protokoll	Kontrolle	1. Pharmakon	2. Pharmakon
25	Gadolinium 100 μM + TTX 1 μM	24,4(12,3/40,2)	22,3(14,1/35,3)	15,0(9,9/22,6)
19	Neostigmin 1 μM + TTX 1 μM	15,4(5,2/40,2)	21,9(8,4/40,3)	23,4(7,3/26,0)
6	Neostigmin 1 μM + ATR 1 μM	17,5(11,9/39,8)	18,6(12,4/41,5)	19,9(12,5/38,0)
13	Neostigmin 5 μM + TTX 1 μM	17,8(9,4/20,9)	24,7(12,3/29,2)	15,7(9,7/23,6)
21	Tropisetron 1 μM + TTX 1 μM	7,8(3,3/15,7)	11,8(4,5/21,4)	11,3(5,0/16,4)
12	ω -Conotoxin GVIA 500 nM + TTX 1 μM	15,3(11,4/24,6)	13,0(7,7/15,5)	12,2(8,4/19,0)
30	Piroxicam 10 μM + TTX 1 μM	22,2(11,2/37,2)	13,4(8,0/22,2)	10,9(6,4/18,7)

Tabelle 34: Human Alter, Widerstand 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe

n=	Alter in Jahren	Widerstand $\Omega \cdot \text{cm}^2$	Sekretionsantworten $\mu\text{A}/\text{cm}^2$
115	66,0(56,0/77,0)	91,1(65,4/123,5)	18,4(10,5/28,2)

Tabelle 35: Humangewebe Männer gegen Frauen dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe

n=	Frauen	Männer
66/49	20,4(11,4/29,5)	15,5(8,8/25,0)

Tabelle 36: Humangewebe nach Diagnosen gruppiert, dehnungsinduzierte Sekretionsantwort in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 1,08 cm^2 20 mmHg Rampe

n=	Divertikulitis	Karzinom	Colitis
22/16/8	14,3(8,2/18,7)	17,7(7,3/21,3)	11,7(3,6/27,7)

Tabelle 37: Meerschweinchen statistische Tests

Kapitel	Gewebe Vergleiche	Test und P-Wert
3.1.1.	Repetitive Diaphragma 1. Stimulation gegen 0 2. Stimulation gegen 0 3. Stimulation gegen 0	One-Sample Signed Rank Test 1. $p=0,250$ 2. $p=0,063$ 3. $p=0,125$
3.1.3.	Repetitiv 1-3. Stimulation 0,5 cm^2	Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Tukey), $p=0,015$ 1 vs. 2
3.1.3.	Repetitiv 1-3. Stimulation 1,08 cm^2	One Way Repeated Measures Analysis of Variance $p=0,118$
3.1.4.	0,5 cm^2 vs. 1,08 cm^2 Messfläche Mucosa/Submucosa	Mann-Whitney Rank Sum Test, erste $p=0,690$, zweite $p=0,622$ dritte $p=0,360$
3.1.4.	0,5 cm^2 vs. 1,08 cm^2 Messfläche Ganzwand-Präparate	Mann-Whitney Rank Sum Test erste Stimulation, $p=0,435$ zweite Stimulation, $p=0,524$ dritte Stimulation, $p=0,833$
3.1.4.	Vergleich der 1.-3. repetitive Stimulation, Ganzwand-Präparate 0,5 cm^2	Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks, $p=0,794$
3.1.4.	Vergleich der 1.-3. repetitive Stimulation, Ganzwand-Präparate 1,08 cm^2	Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Tukey Test, $p<0,001$, 1 vs.3
3.1.5.	Kontrollen: maximale Vorspannung vs. ohne Vorspannung	t-test $p=0,353$
3.1.5.	Kontrolle vs. TTX maximale Vorspannung	Paired t-test, $p=0,133$
3.1.5.	Kontrolle vs. TTX ohne Vorspannung	Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,025$
3.1.5.	Elektrische Stimulation maximale Vorspannung vs. ohne Vorspannung	t-test, $p=0,467$
3.1.6.	10 mmHg mittlere Geschwindigkeit vs. TTX	Paired t-test, $p=0,339$
3.1.6.	10 mmHg schnelle Geschwindigkeit vs. TTX	Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,301$
3.1.6.	20 mmHg mittlere Geschwindigkeit vs. TTX	Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,206$
3.1.6.	20 mmHg langsame Geschwindigkeit vs. TTX	Paired t-test, $p=0,280$
3.1.6.	20 mmHg schnelle Geschwindigkeit vs. TTX	Wilcoxon Signed Rank Test, $p=0,016$
3.1.6.	10 mmHg mittlere Geschwindigkeit vs. schnelle Geschwindigkeit	Mann-Whitney Rank Sum Test, $p=0,268$
3.1.6.	20 mmHg mittlere Geschwindigkeit vs. langsam Geschwindigkeit vs. schnelle Geschwindigkeit	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $p=0,782$

3.1.7.	Kontrolle gegen TTX Mucosa/Submucosa-Präparate 0,5 cm ²	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,206
3.1.7.	Kontrolle vs. TTX Mucosa/Submucosa Präparate 1,08 cm ²	Paired t-test, p=0,447
3.1.7.	Ganzwand-Präparate 1,08 und 0,5 cm ² vs. TTX	Paired t-test, p=0,093
3.1.7.	Ganzwand-Präparate 1,08 cm ² vs. TTX	Paired t-test, p=0,216
3.1.7.	Ganzwand-Präparate Kontrolle vs. TTX serosale Gabe	Paired t-test, p=0,093
3.1.7.	Ganzwand-Präparate Kontrolle vs. TTX mucosale Gabe	Paired t-test, p=0,629
3.1.8.	Dehnungsinduzierte Sekretion Gewebe ohne Netz/Filter vs. mit Netz vs. mit Filter	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Dunn's), p<0,001 Ohne Netz/Filter vs. Filter Netz vs. Filter
3.1.8.	Dehnungsvolumen Gewebe ohne Netz/Filter vs. mit Netz vs. mit Filter	One Way Analysis of Variance, Post-Hoc: (Bonferroni), p <0,001 Ohne Netz/Filter vs. Netz Ohne Netz/Filter vs. Filter
3.1.9.	Kontrolle vs. TTX in 100 mM KCl	Paired t-test, p=0,641
3.1.9.	Kontrolle Standard Krebs vs. Kontrolle KCl	Mann-Whitney Rank Sum Test, p=0,484
3.1.10.	Kontrolle vs. Gadolinium 100 µM	Paired t-test: p=0,078
3.1.10.	Netz: Kontrolle vs. Gadolinium 100 µM	Paired t-test, p=0,916
3.1.10.	Kontrolle vs. Neostigmin 1 µM	Paired t-test, p < 0,001
3.1.10.	Netz: Kontrolle vs. Neostigmin 1 µM	Paired t-test, p < 0,001
3.1.10.	Kontrolle vs Piroxicam 10 µM	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,031
3.1.10.	Netz: Kontrolle vs. Piroxicam 10 µM	Paired t-test, p=0,004
3.1.10.	Filter: Kontrolle vs. Piroxicam 10 µM	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,004
3.1.10.	Kontrolle vs. ω-Conotoxin GVIA 500 nM 0,5 und 1,08 cm ²	Wilcoxon Signed Rank Test, p=1,000
3.1.10.	Kontrolle vs. ω-Conotoxin GVIA 500 nM nur 1,08 cm ²	Paired t-test, p=0,381

Tabelle 38: Humangewebe statistische Tests

Kapitel	n-Zahl	Gewebe Vergleiche	Region	Test und P Wert
3.2.1.	129	Korrelation einzelne Gewebe (µA/cm ²) gegen Druck (mmHg)	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelations- koeffizient 0,704; p=1,348 x 10 ⁻²⁰
3.2.1.	129	Korrelation der einzelnen Gewebe (µA/cm ²) gegen Dehnungsvolumen (µl)	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelationskoeffizient 0,659; p=2,043 x 10 ⁻¹⁷
3.2.1.	7	Korrelation Mediane (µA/cm ²) gegen mmHg Werte	Asc.; Trans.; Sig.	Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelationskoeffizient 0,997, p=0,000000935
3.2.1.	7	Korrelation Mediane (µA/cm ²) gegen die µl Werte	Asc.; Trans.; Sig.	Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelationskoeffizient 0,980; p=0,0001040
3.2.2.	8	dreifach repetitive serosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg	Asc.	One Way Repeated Measures Analysis of

				Variance p=0,047, Post-Hoc Test (Bonferroni)
3.2.2.	6	dreifach repetitive serosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg	Trans.	One Way Repeated Measures Analysis of Variance, p=0,639
3.2.2.	8	dreifach repetitive serosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg	Desc.	Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks, p=0,079
3.2.2.	8	dreifach repetitive serosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg	Sig./Rect.	One Way Repeated Measures Analysis of Variance, p=0,085
3.2.2.	5	Dehnungsvolumen dreifach repetitive serosale Rampendruckstimulationen mit 20 mmHg	Asc.	One Way Repeated Measures Analysis of Variance, p=0,532
3.2.2.	5	Dehnungsvolumen dreifach repetitive serosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg	Trans.	One Way Repeated Measures Analysis of Variance, p=0,348
3.2.2.	7	Dehnungsvolumen dreifach repetitive serosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg	Desc.	One Way Repeated Measures Analysis of Variance, p=0,432
3.2.2.	8	Dehnungsvolumen dreifach repetitive serosale Rampenstimulationen mit 20 mmHg	Sig./Rect.	One Way Repeated Measures Analysis of Variance, p=0,236
3.2.3.	7/5	Kontrollen schnell gegen langsam	Asc.; Sig.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p=0,149
3.2.3.	5	Langsam: Kontrolle vs. TTX	Asc.; Sig.	Paired t-test, p=0,520
3.2.3.	7	Schnell: Kontrolle vs. TTX	Asc.; Sig.	Paired t-test, p=0,693
3.2.4.	Asc., 51 Trans. 45 Desc., 37 Sig/Rect. 106	Serosale Stimulation 20 mmHg je Region	Asc.; Trans.; Desc.; Sig/Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Dunn's), p<0,001: Trans. vs. Desc. Trans. vs. Sig./Rect. Trans. vs. Asc. Asc. vs. Desc Asc. vs. Sig./Rect
3.2.4.	Asc. 18 Trans. 38 Desc. 35 Sig/Rect. 33	Mucosale Stimulation 20 mmHg je Region	Asc., Trans., Desc., Sig./Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, p=0,055
3.2.4.	51/18	Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Asc.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p<0,001
3.2.4.	45/38	Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Trans.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p<0,001
3.2.4.	37/35	Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Desc.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p=0,060
3.2.4.	106/33	Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Sig./Rect.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p<0,001
3.2.4.	Asc. 40 Trans. 44 Desc. 33 Sig/Rect. 99	Dehnungsvolumen (µl): Serosale Stimulation 20 mmHg je Region	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	One Way Analysis of Variance, p=0,758
3.2.4.	Asc. 18 Trans. 16 Desc. 9 Sig/Rect. 29	Dehnungsvolumen (µl) mucosale Stimulation 20 mmHg je Region	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	One Way Analysis of Variance, p=0,335

3.2.4.	Asc. 40 Trans. 44 Desc. 33 Sig/Rect. 99	Dauer: Serosale Stimulation 20 mmHg je Region	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Dunn's, p<0,001 Trans. vs. Desc. Trans. vs. Sig./Rect
3.2.4.	Asc. 18 Trans. 16 Desc. 9 Sig/Rect. 29	Dauer: Mucosale Stimulation 20 mmHg je Region	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	One Way Analysis of Variance, p=0,083
3.2.4.	40/18	Dehnungsvolumen: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Asc.	t-test, p=0,646
3.2.4.	44/16	Dehnungsvolumen: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Trans.	t-test, p=0,674
3.2.4.	33/9	Dehnungsvolumen: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Desc.	t-test, p=0,015
3.2.4.	99/29	Dehnungsvolumen: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Sig./Rect.	t-test, p=0,948
3.2.4.	40/18	Dauer: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Asc.	t-test, p=0,684
3.2.4.	16/44	Dauer: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Trans.	t-test, p=0,013
3.2.4.	33/9	Dauer: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Desc.	t-test, p=0,149
3.2.4.	99/29	Dauer: Serosal vs. mucosal 20 mmHg	Sig./Rect.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p=0,124
3.2.5.	14	Kontrollen gegen TTX serosale Stimulation	Asc.	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,025
3.2.5.	6	Kontrollen gegen TTX serosale Stimulation	Trans.	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,094
3.2.5.	10	Kontrollen gegen TTX serosale Stimulation	Desc.	Paired t-test, p=0,251
3.2.5.	19	Kontrollen gegen TTX serosale Stimulation	Sig./Rect.	Paired t-test, p=0,362
3.2.5.	9	Kontrollen gegen TTX mucosale Stimulation	Asc.	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,820
3.2.5.	6	Kontrollen gegen TTX mucosale Stimulation	Trans.	Paired t-test, p=0,160
3.2.5.	6	Kontrollen gegen TTX mucosale Stimulation	Desc.	Paired t-test, p=0,228
3.2.5.	12	Kontrollen gegen TTX mucosale Stimulation	Sig.	Paired t-test, p=0,883
3.2.6.	Asc. 8 Trans. 5 Desc. 6 Sig/Rect. 13	Regionenvergleich der serosal gepulsten Stimulation	Asc.; Tran.; Desc.; Sig./Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, p=0,084
3.2.6.	Asc. 8 Trans. 4 Desc. 5 Sig/Rect. 10	Regionenvergleich der mucosal gepulsten Stimulation	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, p=0,505
3.2.6.	8/8	Serosal gepulst vs. mucosal gepulst	Asc.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p=0,028
3.2.6.	5/4	Serosal gepulst vs. mucosal gepulst	Trans.	Mann-Whitney Rank Sum Test, p=0,111
3.2.6.	6/5	Serosal gepulst vs. mucosal gepulst	Desc.	t-test, p=0,224
3.2.6.	13/10	Serosal gepulst vs. mucosal gepulst	Sig./Rect.	t-test, p=0,015
3.2.6.	51/8	Serosal vs. serosal gepulst	Asc.	Mann-Whitney Rank Sum Test p=0,731

3.2.6.	45/5	Serosal vs. serosal gepulst	Trans.	Mann-Whitney Rank Sum Test p=0,272
3.2.6.	37/6	Serosal vs. serosal gepulst	Desc.	Mann-Whitney Rank Sum Test p=0,494
3.2.6.	106/13	Serosal vs. serosal gepulst	Sig./Rect.	Mann-Whitney Rank Sum Test . p=0,263
3.2.6.	18/8	Mucosal vs. mucosal gepulst	Asc.	Mann-Whitney Rank Sum Test p=0,890
3.2.6.	38/4	Mucosal vs. mucosal gepulst	Trans.	t-test p=0,192
3.2.6.	35/5	Mucosal vs. mucosal gepulst	Desc.	t-test p=0,484
3.2.6.	33/10	Mucosal vs. mucosal gepulst	Sig./Rect.	Mann-Whitney Rank Sum Test p=0,267
3.2.7.	8	Serosal gepulsten Stimulation der Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Asc.	Paired t-test, p=0,329
3.2.7.	5	Serosal gepulsten Stimulation der Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Trans.	Paired t-test, p=0,389
3.2.7.	6	Serosal gepulsten Stimulation der Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Desc.	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,313
3.2.7.	13	Serosal gepulsten Stimulation der Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Sig./Rect.	Paired t-test, p=0,115
3.2.7.	8	Mucosal gepulsten Stimulation der Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Asc.	Paired t-test, p=0,625
3.2.7.	4	Mucosal gepulst: Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Trans.	Paired t-test, p=0,375
3.2.7.	5	Mucosal gepulst: Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Desc.	Paired t-test, p=0,952
3.2.7.	9	Mucosal gepulste Stimulation der Kontrollen vs. Stimulation in TTX	Sig./Rect.	Wilcoxon Signed Rank Test, p=0,129
3.2.8.	23	Standardkrebs vs. Cl ⁻ frei und Cl ⁻ frei- gegen Standardkrebs	Asc.; Trans.; Desc.; Sig	Wilcoxon Signed Rank Test, p<0,001, Paired t-test, p<0,001
3.2.8.	25	Standardkrebs vs. Cl ⁻ / HCO ₃ ⁻ frei und Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ frei vs. Standardkrebs	Asc.; Trans.; Desc.; Sig	Wilcoxon Signed Rank Test, p<0,001, Wilcoxon Signed Rank Test, p<0,001
3.2.8.	23/25	Cl ⁻ frei vs. Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	Asc.; Trans.; Desc.; Sig	Mann-Whitney Rank Sum Test, p<0,001
3.2.8.	25	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ vs. 0	Asc.; Trans.; Desc.; Sig	One-Sample Signed Rank Test p<0,001
3.2.9.	Gewebe ohne Netz/ Filter: 106 Gewebe mit Netz: 34 Gewebe mit Filter: 13	Sekretionsantwort (μA/cm ²) Gewebe ohne Netz oder Filter, mit Netz, mit Filter	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post-Hoc Test (Dunn's), p<0,001: Gewebe ohne Netz oder Filter vs. Netz Gewebe ohne Netz oder Filter vs. Filter

3.2.9.	Gewebe ohne Netz/ Filter: 106 Gewebe mit Netz: 34 Gewebe mit Filter: 13	Dehnungsvolumen (μ l) Gewebe ohne Netz oder Filter, mit Netz, mit Filter	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Post hoc Dunn's, $p < 0,001$: Gewebe ohne Netz oder Filter vs. Netz Gewebe ohne Netz oder Filter vs. Filter
3.2.9.	14	Filter Sekretionsantwort vs. 0	Asc.; Trans.; Desc.; Sig.	One-Sample t-test, $p = 0,004$
3.2.11.	14/14	PGE ₂ vs. TTX PGE ₂ - Sekretionsantwort	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Mann-Whitney Rank Sum Test, $p = 0,730$
3.2.10.	25 25	Kontrolle vs. Gadolinium Gadolinium vs. TTX	Asc.; Trans.; Desc.; Sig.	Paired t-test, $p = 0,730$ und Wilcoxon Signed Rank Test, $p < 0,001$ (signifikant nach Bonferroni $p < 0,025$)
3.2.10.	19 19	Kontrolle vs. Neostigmin 1 μ M Neostigmin 1 μ M vs. TTX	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,016$, Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,029$, (signifikant nach Bonferroni $p < 0,025$)
3.2.10.	13 13	Kontrolle vs. Neostigmin 5 μ M Neostigmin 5 μ M vs. TTX	Asc.; Trans.; Sig.	Paired t-test, $p < 0,001$, Paired t-test, $p = 0,160$
3.2.10.	6 6	Kontrolle vs. Neostigmin 1 μ M Neostigmin 1 μ M vs. ATR	Asc.; Trans.; Desc.; Sig.	Paired t-test, $p = 0,268$, Paired t-test, $p = 0,556$
3.2.10.	21 21	Kontrolle vs. Tropicsetron Tropicsetron vs. TTX	Asc.; Trans.; Desc.; Sig.	Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,020$, Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,702$
3.2.10.	12 12	Kontrolle vs. ω -Conotoxin ω -Conotoxin vs. TTX	Asc.; Trans.; Desc.; Sig.	Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,021$, Paired t-test, $p = 0,816$
3.2.10.	30 30	Kontrolle vs. Piroxicam Piroxicam vs. TTX	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Wilcoxon Signed Rank Test, $p < 0,001$, Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,005$
3.2.12.	115	Korrelation Widerstand und Alter	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelationskoeffizient - 0,0566; $p = 0,548$
3.2.12.	115	Sekretionsantwort und Alter	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Pearson Produktmoment Korrelation, Korrelationskoeffizient 0,114; $p = 0,225$
3.2.12.	66/49	Weiblich vs. Mannlich	Asc.; Trans.; Desc.; Sig./Rect.	Mann-Whitney Rank Sum Test, $p = 0,105$
3.2.12.	Divertikulitis: 22 Karzinom:16 Colitis:8	Diagnose μ A/cm ² : Divertikulitis vs. Karzinom vs. Colitis	Sig./Rect.	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $p = 0,836$
3.2.13.	5	Repetitive Rampenstimulation (μ A/cm ²)	Ileum	One Way Repeated Measures Analysis of Variance, $p = 0,902$

Tabellen

3.2.13.	17	Serosal vs.TTX	Ileum	Paired t-test, $p < 0,001$
3.2.13.	5	Mucosal vs. TTX	Ileum	Paired t-test, $p = 0,036$
3.2.13.	22/7	Serosal vs. mucosale Stimulation	Ileum	Mann-Whitney Rank Sum Test, $p = 0,098$

8.2. Danksagung

Zu allererst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Michael Schemann, der mich über die Projektzeit hinweg zu allen Zeiten mit Rat und Tat unterstützte. Besonders bedanke ich mich bei ihm für die Schaffung meiner Promotionsstelle und damit für die Möglichkeit zu dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich außerdem für die umfangreiche Betreuung und ständige Erreichbarkeit in den letzten fast vier Jahren sowie für die viele Geduld, vor allem bei Problemen und bei den Korrekturarbeiten.

Ganz herzlich danke ich außerdem Frau Dr. Dagmar Krüger, die mich in die Geheimnisse der Ussing-Kammer einweichte. Zusätzlich danke ich ihr für die vielen wertvollen Tipps zu wissenschaftlichen Fragen rund um die Experimente mit Humangewebe in der Ussing-Kammer.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Herrn Dr. Klaus Michel für seine ständige Hilfe bei allen Problemen bedanken. Dank seiner Geduld konnte immer eine Lösung gefunden werden, egal bei welchen Themen.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Sabine Bühner für die Hilfe bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen und die „Erste Hilfe-Maßnahmen“, sowie auch bei Frau Dr. Anita Annaházi für die vielen Informationen rund um die Verdauung.

Natürlich danke ich auch Birgit Kuch und Marlene Redl für die viele Hilfe bei der Gewebepräparation sowie für die stetige Unterstützung im Labor.

Danke an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls für die vielen schönen Momente die ich mitnehmen durfte!

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Mentor Herrn Dr. Holger Hübel für die ständige Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mich stetig auf meinem Lebensweg begleiten, mir mein Studium und diese Doktorarbeit ermöglichten und immer für mich da sind.

8.3. Publikationen

Krueger D, **Schäuffele S**, Zeller F, Demir IE, Theisen J, Michel K, Schemann M. Peppermint and caraway oils have muscle inhibitory and pro-secretory activity in the human intestine in vitro. *Neurogastroenterol Motil.* 2020 Feb;32(2):e13748. doi: 10.1111/nmo.13748. Epub 2019 Oct 15. PMID: 31612595.

Michel K, Krüger D, **Schäuffele S**, Zeller F, Demir IE, Theisen J, Schemann M. Fast synaptic excitatory neurotransmission in the human submucosal plexus. *Neurogastroenterol Motil.* 2021 Aug;33(8):e14164. doi: 10.1111/nmo.14164. Epub 2021 May 7. PMID: 33960578.

Abstract:

Schemann, M., **Schäuffele, S.**, Krueger, D., Demir, I.E., Theisen, J., Zeller, F.: Distension induced epithelial secretion in human intestine in vitro. 11th Congress of the international societ