

II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. R.M. Schmid)

## **Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung der neuromuskulären Übertragung im Dickdarm der Maus**

Andrei Sibaev

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. H.-D. Allescher

2. Univ.- Prof. Dr. R.M. Schmid

Die Dissertation wurde am 09.01.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.05.2003 angenommen.

# **Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung der neuromuskulären Übertragung im Dickdarm der Maus**

Andrei Sibaev

II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. R.M. Schmid)

gewidmet

meiner Frau Marina

meinen Kindern Mischa, Ira und Kolka

1	Einführung .....	7
2	Abkürzungsverzeichnis.....	9
3	Material und Methoden.....	10
3.1	Versuchstiere .....	10
3.2	Versuchsanordnung .....	10
3.2.1	Allgemein.....	10
3.2.2	Gewebepräparation für elektrophysiologische Untersuchungen .....	11
3.2.3	Intrazelluläre Ableitung .....	12
3.2.4	Gewebepräparation für Hämatoxilin-Eosin Färbung.....	15
3.2.5	Gewebepräparation für "Whole-mount" NADPH-Diaphorase, Cuprolinic und Methylenblau Färbung.....	15
3.2.6	Gewebepräparation für Färbung Zirkumferenz-erhaltende 3D Präparaten. ....	15
3.3	Färbungsprotokolle.....	16
3.3.1	NADPH-Diaphorase Färbung .....	16
3.3.2	Methylenblau Färbung.....	16
3.3.3	Cuprolinic-blue Färbung .....	16
3.3.4	Hämatoxilin-Eosin Färbung .....	17
3.4	Datenauswertung .....	18
3.4.1	Elektrophysiologische Untersuchungen.....	18
3.4.2	Quantifizierung der neuronalen Dichte in mit NADPH-Diaphorase und Cuprolinic blue gefärbten Präparaten.....	19
3.5	Statistik.....	19
3.6	Verwendete Substanzen .....	20
3.7	Geräte .....	21
4	Ergebnisse .....	22
4.1	Elektrophysiologische Eigenschaften des proximalen Kolon.....	22
4.1.1	Basalaktivität .....	22
4.1.2	Versuche unter NANC-Bedingungen.....	22
4.1.3	Einfluss von elektrischer Feldstimulation.....	23
4.1.4	Einfluss von Tetrodotoxin (TTX) .....	24
4.1.5	Einfluss von N <sup>G</sup> -nitro-L-Arginin (L-NNA).....	25
4.1.6	Einfluss von Apamin .....	27

4.2	Regionale Unterschiede der elektrophysiologischen Eigenschaften im Dickdarm der Maus. ....	29
4.2.1	Ruhemembranpotential. ....	29
4.2.2	Elektrische Feldstimulation.....	29
4.3	Histologische und histochemische Charakterisierung des Plexus myentericus Dickdarm der Maus. ....	36
4.3.1	NADPH-Diaphorase Histochemie.....	36
4.3.2	Methylenblau Vitalfärbung. ....	40
4.3.3	Cuprolinic blue Färbung .....	42
4.3.4	Lichtmikroskopie unter seitlicher Belichtung.....	43
4.3.5	Hämatoxylin-Eosin Färbung (Übersichtsfärbung).....	44
4.4	Anatomie der ICC im oligoganglionären Region.....	45
4.5	Regionale Unterschiede in Aufbau des enterischen Nervensystem des gesamten Dickdarm der Maus.....	46
4.5.1	Histologische und Histochemische Charakterisierung des Plexus myentericus in „Whole-mount“ Präparaten. ....	50
4.6	Elektrophysiologie der oligoganglionären Region.....	54
5	Allgemeine Diskussion .....	56
5.1	Anatomie des Dickdarms.....	56
5.2	Glatte Muskulatur .....	57
5.3	Neuronentypen und Einteilung nach Dogiel .....	57
5.4	Elektrisches Verhalten des Plexus myentericus .....	59
5.5	“Interstitial cells of Cajal” .....	60
5.5.1	Morphologie von ICC .....	62
5.6	Neuromuskuläre Interaktion im Gastrointestinaltrakt. ....	65
5.7	Wichtige Überträgerstoffe.....	69
5.7.1	Azetylcholin. ....	70
5.7.2	NO .....	70
5.7.3	ATP .....	70
5.7.4	VIP.....	71
5.7.5	PACAP .....	71
5.8	Inhibitorische Neurotransmission in Gastrointestinaltrakt. ....	72
5.9	Stickstoffmonoxid (NO).....	73
5.9.1	Synthese und Metabolismus von NO .....	73

5.9.2	Mechanismen der Signaltransduktion von Stickstoffmonoxid (NO) .....	75
5.9.3	NOS-Inhibitoren .....	77
5.9.4	Lokalisation der NOS im Gastrointestinaltrakt .....	77
6	Spezielle Diskussion .....	79
7	Zusammenfassung .....	83
8	Verzeichnis Abbildungen .....	85
9	Danksagungen .....	90
10	Literaturliste .....	91
11	Lebenslauf .....	107

# 1 Einführung

Das enterische Nervensystem verkörpert die grösste und strukturell komplexeste neuronale Organisationseinheit ausserhalb des ZNS und steuert zahlreiche wesentliche Funktionsabläufe des Gastrointestinaltrakts. Bei entzündlichen Darmerkrankungen, (Horowitz *et al.*, 1987), hypertropher Pylorusstenose (Chenais *et al.*, 1991), Morbus Hirschsprung (Forstermann *et al.*, 1989) sind pathologische Funktionsänderungen des enterischen Nervensystems nachgewiesen (Langer *et al.*, 1995). Da funktionelle Untersuchungen am Menschen aus ethischen Gründen und durch die begrenzte Verfügbarkeit von Gewebe extrem limitiert sind, wurde eine ganze Reihe von Tiermodellen etabliert, die diese pathologische Zustände imitieren. Molekularbiologische Fortschritte wie die Entwicklung von Mutanten, bei denen die Expression bestimmter Gene von Strukturproteinen Signaltransduktions-Schlüsselstellen ausgeschaltet sind (Knock-out-Tiere) erlauben, die Signalverarbeitung im Detail zu untersuchen (Huang *et al.*, 1993; Mashimo *et al.*, 1996; Ny *et al.*, 2000).

Die homologe Rekombination wird von allem am Mäusen durchgeführt. Doch gerade über die Anatomie und physiologische Funktion des enterischen Nervensystems der Maus gibt es relativ wenige grundlegende Arbeiten.

NO (Stickstoffmonoxid) ist als inhibitorischer Neurotransmitter im enterischen Nervensystem des Gastrointestinaltrakts seit einigen Jahren bekannt und etabliert (Sanders & Ward, 1992; Shuttleworth *et al.*, 1997). Die Synthese, Freisetzung und Wirkung von NO konnte im ZNS und in peripheren nicht-adrenergen-nicht-cholinergen Neuronen nachgewiesen werden und reguliert die Magen-Darm-Peristaltik (Ciccocioppo *et al.*, 1994; Spencer *et al.*, 1999b).

Der myenterische Plexus des enterischen Nervensystems ist für die Kontrolle der Peristaltik des Darmes verantwortlich. Eine grosse Anzahl von Neuronen in diesem Plexus erhalten NOS und werden durch NADPH-Diaphorase Färbung dargestellt (Furness *et al.*, 1994). Ganglien dieses Plexus sind im Dünndarm nach Auerbach in einer definierten Schicht der Darmwand homogen innerhalb des schlauchförmigen Organs verteilt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, anhand von morphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen folgende Fragen zu beantworten:

- Gibt es regionale Unterschiede in der Innervation des Mäusekolon, die für die dessen experimentelle Untersuchungen bedeutsam sind?
- Existieren strukturelle Unterschiede in der inhibitorischen, vorwiegend nitroerg vermittelten Innervation verschiedener Regionen des Mäusecolons ?

## 2 Abkürzungsverzeichnis

ENS: Enterisches Nervensystem  
EFS: Elektrische Feldstimulation  
CED: Chronisch entzündliche Darmerkrankung  
H-E: Hämatoxilin-Eosin Färbung  
GM: glatten Muskelzellen  
ICC: Interstitielle Zellen von Cajal  
IJP: Inhibitorische Junctionspotentiale  
KRP: Krebs Ringer Puffer  
LM: Longitudinale Muskulatur  
L-NNA: N<sup>G</sup> -nitro-L-Arginin  
NADPH: Nicotinamide dinukleotid Phosphat  
MP: myenterische Plexus  
NO: Stickstoffmonoxid  
NOS: Stickstoffmonoxidsynthase  
n.s.: nicht signifikant  
RMP: Ruhemembranpotential  
TTX: Tetrodotoxin  
WM: "Whole-mount" Präparate  
ZM: Zirkuläre Muskulatur

### **3 Material und Methoden**

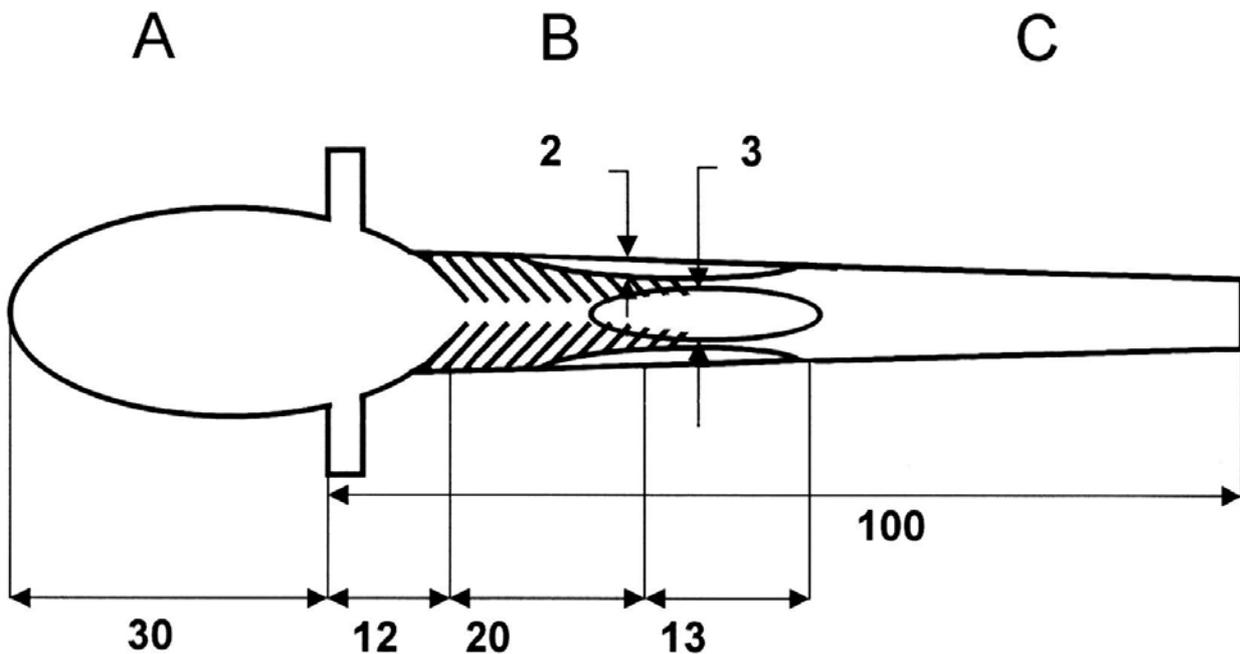
#### **3.1 Versuchstiere**

Das proximales Kolon, bzw. der ganze Dickdarm, wurden für die funktionellen und morphologischen Studien aus männlichen, erwachsenen BALB/c, C III H oder C57BL/6 Mäusen (Charles River Wiga GmbH in Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 25 g bis 35 g entnommen. Alle Versuchstiere wurden vor den Experimenten unter standardisierten Bedingungen in einem voll klimatisierten Raum bei künstlichem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Ihre Ernährung bestand aus Trockenfutter und Wasser. Die Tiere wurden, unter CO<sub>2</sub>- Narkose dekapitiert. Bei allen Versuchen wurde der für die Experimente notwendige Abschnitt des Gastrointestinaltraktes sofort entnommen, und für die Präparation in Krebs-Ringer-Puffer (KRP) überführt.

#### **3.2 Versuchsanordnung**

##### **3.2.1 Allgemein**

Die proportionale Grösse des Dickdarms hängt vom Gewicht der Tiere, dem intraluminalen Inhalt und der Temperatur der Präparationslösung ab. Für die histologischen ("Whole-mount" Präparate) und elektrophysiologischen Untersuchungen war es notwendig, ein relativ schmales (ca. 5 mm) Segment einer bestimmten Region des proximalen Kolons gezielt zu untersuchen und zu schneiden. Als Fixpunkte wurden das Fischgrätenmuster der Mucosa im proximalen Kolon, die ileozökale Klappe und die Abschnittsgrenze an der Beckenbodenebene ausgewählt, die unabhängig waren vom Tiergewicht, der Temperatur des Präparationsbades oder der Vorbehandlung (s. Abb.1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des gesamten Dickdarms der Maus. Abschnitt A - Zökum; B - proximales Kolon; C - distales Kolon. (in mm)**

### 3.2.2 Gewebepreparation für elektrophysiologische Untersuchungen

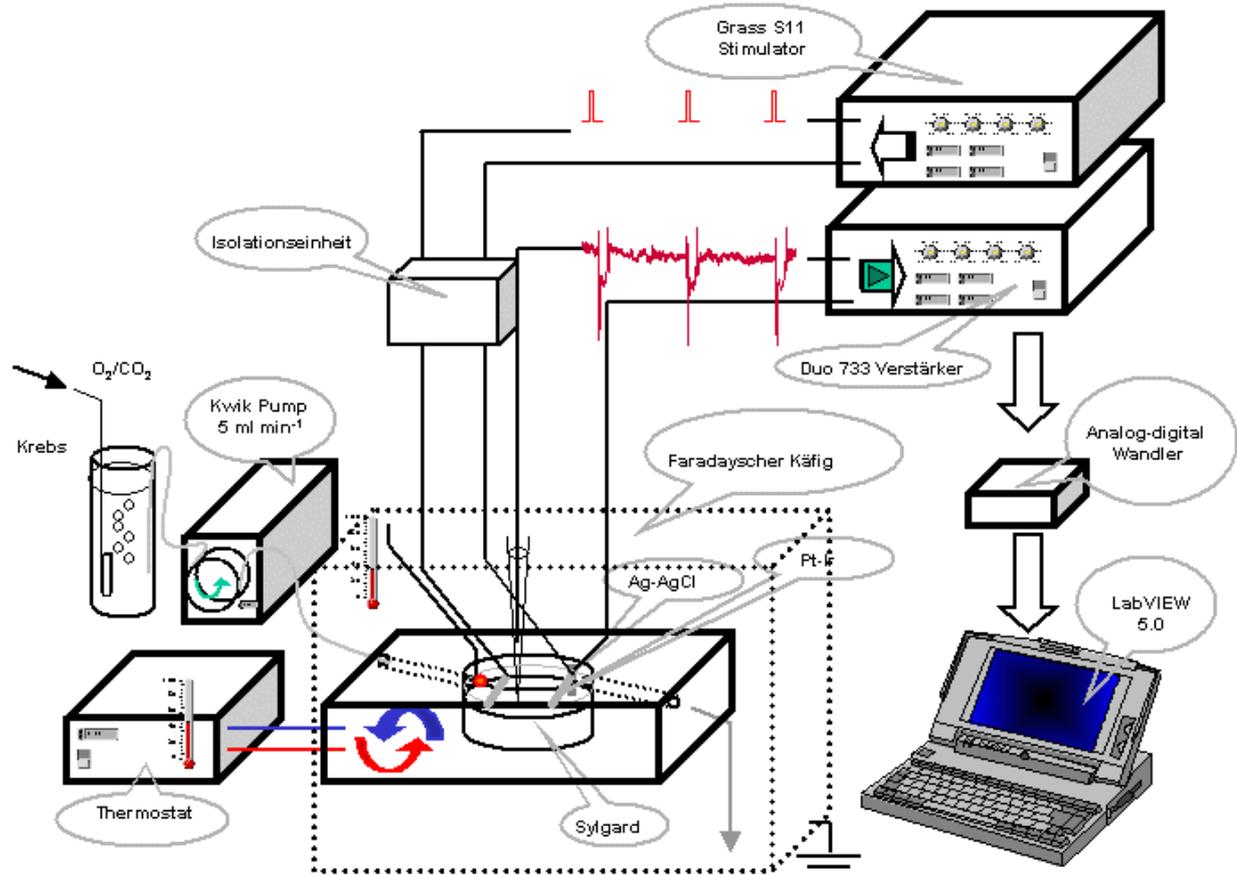
Der komplette Dickdarm wurde durch einen medianen Bauchschnitt entnommen und in ein Präparationsbad überführt. Alle Präparationsschritte wurden in mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) oxygeniertem Krebs-Ringer Puffer (KRP: NaCl 115.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.16 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.16 mM, Glucose 11.1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 21.9 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, KCl 4.16 mM) durchgeführt. Vom ganzen Dickdarm wurde das mesenteriale Fettgewebe abpräpariert und der Darm entlang des mesenterialen Randes scharf geöffnet und von faecalen Massen durch wiederholte Spülung gereinigt. Das Gewebe wurde dann stereomikroskopisch gesteuert weiterpräpariert, die Mucosa und Submucosa nach Identifikation mit Präzisionsspinzetten durch Zug von der Tunica muscularis abgetrennt. Anschliessend wurde ein etwa 3 mm langes Segment der Tunica muscularis mit dem enthaltenen myenterischen Plexus des proximalen Kolon bzw. Zökum oder distalen Kolon parallel zur zirkulären Muskelschicht abgeschnitten und für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet.

### 3.2.3 Intrazelluläre Ableitung

Kleinste Gewebeabschnitte (Zökum, proximales oder distales Kolon, oder 30 mm lange Segmente vom proximalen Kolon) wurden zur Minimierung der bei 37°C beträchtlichen Spontanbewegung des Gewebes mit feinen Wolfram Nadeln (15, 25 µm Diameter) an dem mit Sylgard ausgegossenen Boden der elektrophysiologischen Messkammer so fixiert, dass die zirkuläre Muskelschicht nach oben zeigt. Die Messkammer wurde konstant (5 ml/min<sup>-1</sup>; Kwik Pump, World Precision Instruments) mit auf 37 °C vorgewärmtem und oxygeniertem KRP perfundiert. Nur nach Gewebefixierung war eine intrazelluläre Ableitung von stabilen Membranpotentialen möglich, da sonst Bewegungsartefakte zu Impedanzänderung der Glaskapillare und des Kapillar-Zellkontaktes bis hinzu Kontaktverlusten aufgetreten wären. In speziellen Versuchsgängen wurde zur weiteren Herabsetzung der Spontanbewegung der L-Typ Calciumkanal- Antagonist Nifedipin zugesetzt (De Ponti *et al.*, 1989). Dieser hemmt über Eingriffe an den muskulären L-typ Calciumkanälen die elektromechanische Kopplung, ohne die elektrischen Eigenschaften der neuromuskulären Transmission wesentlich zu verändern (Sanders & Smith, 1986). Während das Gewebe nach Ausspannen und Fixieren äquilibrierte, wurden über Mikromanipulatoren feingesteuert Paare von Mikro-Stimulationselektroden aus Platin (2.5 mm<sup>2</sup> Stimulationsoberfläche) die über eine Stimulus-Isolationseinheit (Isolation unit, Grass SIU59) mit einem Grass S11 Stimulator verbunden waren, senkrecht zur zirkulären Muskelschicht am Gewebe angebracht. Damit konnten die Neurone bestimmter Gewebeabschnitte durch ein elektrisches Feld ( einzelne Stimuli, 10 Pulse bei 1 oder 5 Hz, 0.3 ms Dauer, 15 V Stärke) stimuliert werden. Der gesamte Versuchsaufbau, wie das Einbringen der Platinelektroden und nach der Äquilibrationsphase (90 bis 120 Minuten) das Einstechen der Glaskapillare, fanden in einem Faradayschen Käfig statt (s.Abb.2).

Kapillarglasmikroelektroden (borosilicat Glas Kapillare, 1.0 mm OD x 0.58 mm ID Clark Electromedical Instruments) wurden mit einem Mikroelektrodenpuller (Model P-97, 3 mm Heizfaden; Sutter Instrument Co) gezogen und mit KCL (3 M) angefüllt und hatten so eine Resistenz im Bereich von 100-150 MΩ. Die elektrische Aktivität wurde gegen eine in der Messkammer plazierte Ag-AgCl "Erdungs" Elektrode registriert und danach mit einem DUO 733 Mikroelektrode-Verstärker verstärkt (World Precision Instruments).

Das analoge Ausgangssignal vom Verstärker wurde mit Analog-Digital Wandler und einer Datenakquisitionskarte (SCB 68 interface, National Instruments) in digitale Signale umgewandelt und digital auf einem PC mittels LABVIEW Version 5.0. aufgezeichnet. Die Amplituden (mV) der elektrischen Ereignisse wurden im Vergleich zum RMP vor der Applikation des elektrischen Stimuli gemessen.



**Abbildung 2:** Die Streifen der zirkulären und longitudinalen muskulären Schicht mit erhaltenem Plexus myentericus wurden mit Wolframs Nadeln (15, 25  $\mu\text{m}$  Diameter) auf dem aus Sylgard ausgegossene Boden der electrophysiologischen Kammer so fixiert, dass die zirkuläre Muskelschicht nach oben zeigte. Das Gewebe wurde konstant mit vorgewärmtem (37°C, pH 7.4) begasten KRP perfundiert. Kapillarglasmikroelektroden wurden gezogen, mit KCL (3 M) angefüllt (Resistenz 100-150 M $\Omega$ ). Die Neuronen wurden durch ein Paar senkrecht zur zirkulären Muskelschicht plazierten Platin-Iridium Elektroden stimuliert, die über eine Isolationseinheit mit einem Stimulator verbunden waren. Die zelluläre Antwort wurde gegen in organbadplazierte Ag-AgCl "Erdungs" Elektrode registriert und danach mit einem Verstärker verstärkt. Das analoge Ausgangssignal des Verstärkers wurde in digitale Form umgewandelt und auf dem PC mittels LABVIEW Version 5.0 gespeichert.

### **3.2.4 Gewebepräparation für Hämatoxilin-Eosin Färbung.**

Die über Nacht in 4% Formalinlösung fixierten Präparate vom proximalen und distalen Kolon wurden in steigender Konzentrationsreihe von Alkohol und Xylol entwässert und in Paraffin eingebettet. Die ca. 3 mm langen Präparate wurden in histologische Schalen senkrecht zum Boden plziert und mit vorgewärmtem Parafin in Blöcke gegossen. Nach dem Schneiden der Präparate (10 µm Dicke), wurden die Schnitte auf Objektträger im Wärmebad positioniert, über Nacht bei 50 Grad getrocknet und anschliessend entparafiniert Xylol→absoluter Alkohol→70% Alkohol je 5 min.

### **3.2.5 Gewebepräparation für "Whole-mount" NADPH-Diaphorase, Cuproinic und Methylenblau Färbung**

Der Dickdarm von Balb/c, C-III-H oder C57/BL6 Mäusen wurde wie für elektrophysiologische Untersuchungen entnommen. Segmente vom Zökum, proximalen und distalen Kolon wurden scharf entlang der mesenterialen Grenze geöffnet, mehrmals mit KRP plus Nifedipin, Atropin und Guanethidin (je 1µM) gewaschen und für die weitere Präparation ausgebreitet. Mucosa und Submucosa wurden stumpf abpräpariert, muskuläre Schichten wurden unter leichtem Zug (ca. 125% der normalen Grösse) am Boden der Färbekammer aufgepinnt.

### **3.2.6 Gewebepräparation für Färbung Zirkumferenz-erhaltende 3D Präparaten.**

Männliche Balb/c, C-III-H oder C57/BL6 wurden unter CO<sub>2</sub> Narkose wie beschrieben dekapitiert. Der gesamte Dickdarm mit erhaltenem terminalem Ileum wurde durch Mittelbauchschnitt entnommen und im Präparationsbad mit vorgewärmtem KRP (37°C) plus Nifedipin, Atropin und Guanethidine (je 1µM) plziert. Das Lumen des terminalen Ileum wurde katheterisiert und mit KRP vorsichtig durchgespült. Dann wurde das ganze Organ mit flüssigem Paraffin vom oralen Ende mit maximalen positivem Druck von ca. 5 cm H<sub>2</sub>O aufgefüllt und schliesslich beidseitig mit einem Faden verschlossen. Manche Präparate wurden statt mit Paraffin mit Sylgard angefüllt.

### **3.3 Färbungsprotokolle**

#### **3.3.1 NADPH-Diaphorase Färbung**

Das für die NADPH-Diaphorase Färbung vorbereitete Gewebe wurde 2 Stunden lang in 4 % Paraformaldehyd bei Zimmertemperatur fixiert (Hope & Vincent, 1989). Die NADPH Diaphorase Aktivität wurde unter ständiger visueller Kontrolle dargestellt durch Inkubation bei 37°C für 2 Stunden mit 0.05 M Tris-HCl Puffer (pH 8.0) enthaltend 0.1mM - NADPH, 0.05 mM Nitroblue Tetrazolium und 0.3 % Triton X-100. Die Reaktion wurde durch Abwaschung und mehrmalige Spülung mit 0.05 M Tris-HCl Puffer gestoppt. Dann wurden die Präparate luftgetrocknet, auf dem Objektträgerglas plaziert und mit DePeX abgedeckt.

NOS-positive Strukturen des Plexus myentericus (NOS-positive Neurone, primärer, sekundärer und tertiärer Plexus Myentericus) wurden durch Umwandlung des Tetrazolium Blau in unlösliche Form unter Wirkung der NADPH-Diaphorase dargestellt (Balaskas *et al.*, 1995)

#### **3.3.2 Methylenblau Färbung**

Für die Methylenblau Färbung nach Ehrlich wurde unfixiertes Gewebe mit 0.05% Methylenblau Lösung unter ständiger Sauerstoffzufuhr und visueller Kontrolle der Färbungsintensität behandelt. Wenn die gewünschte Färbung erreicht war, wurde das Präparat in eine 8% wässrige Ammonium molybdat Lösung für 2 bis 3 Stunden plaziert. Die weiteren Prozeduren verliefen entsprechend der NADPH-Diaphorase Färbung.

#### **3.3.3 Cuproinic-blue Färbung**

Das für die Cuproinic-blue Färbung vorbereitete Gewebe wurde auf dem Boden der Farbkammer mit Vorspannung befestigt und in Canoyischer Lösung (1 Std.) fixiert (Van Ginneken *et al.*, 1999). Der Farblösung (0.3% Cuproinic-blue in 0.025 M Natrium Acetat Puffer (pH 5.6)) wurde Magnesium Chlorid zugefügt (2.03 g  $MgCl_2 \times 6H_2O$  in 10 ml

von Farblösung ergab 1.0 M Lösung). Die Präparate wurden für 60 Minuten in die Farblösung bei Raumtemperatur plaziert, mehrmals in destilliertem Wasser ausgespült und anschliessend in Natrium Acetat Puffer 0.025 M (PH 5.6) mit 1.0 M MgCl<sub>2</sub> für 30 Minuten entfärbt. Schliesslich wurden die Präparate in absolutem Alkohol entwässert, in Xylen gereinigt und mit DePeX eingedeckt.

### **3.3.4 Hämatoxilin-Eosin Färbung**

Die Querschnitte des proximalen und distalen Kolon wurden nach der Standardmethode gefärbt

- entparaffinierte Schnitte in Hämatoxylin färben 5 Minuten
- Spülen mit Wasser
- Differenzieren in 1%igem Salzsäure-Alkohol 3 Sekunden
- Wässern bis zur intensiven Blaufärbung mindestens 30 Minuten
- Gegenfärben in 1%iger alkoholischer Eosinlösung 3 Minuten
- Entwässern und Eindecken

### 3.4 Datenauswertung

#### 3.4.1 Elektrophysiologische Untersuchungen

Für die Auswertung der elektrophysiologischen Experimente am Dickdarm der Maus wurde die Veränderung des RMP nach elektrischer Feldstimulation gemessen und die maximale Amplitude des IJPs ermittelt (Watson *et al.*, 1996b) und in eine schnelle Komponente während der ersten 500 ms und eine zweite, langsame Komponente im Zeitraum 5-9 Sekunden unterteilt (s. Abb.3).

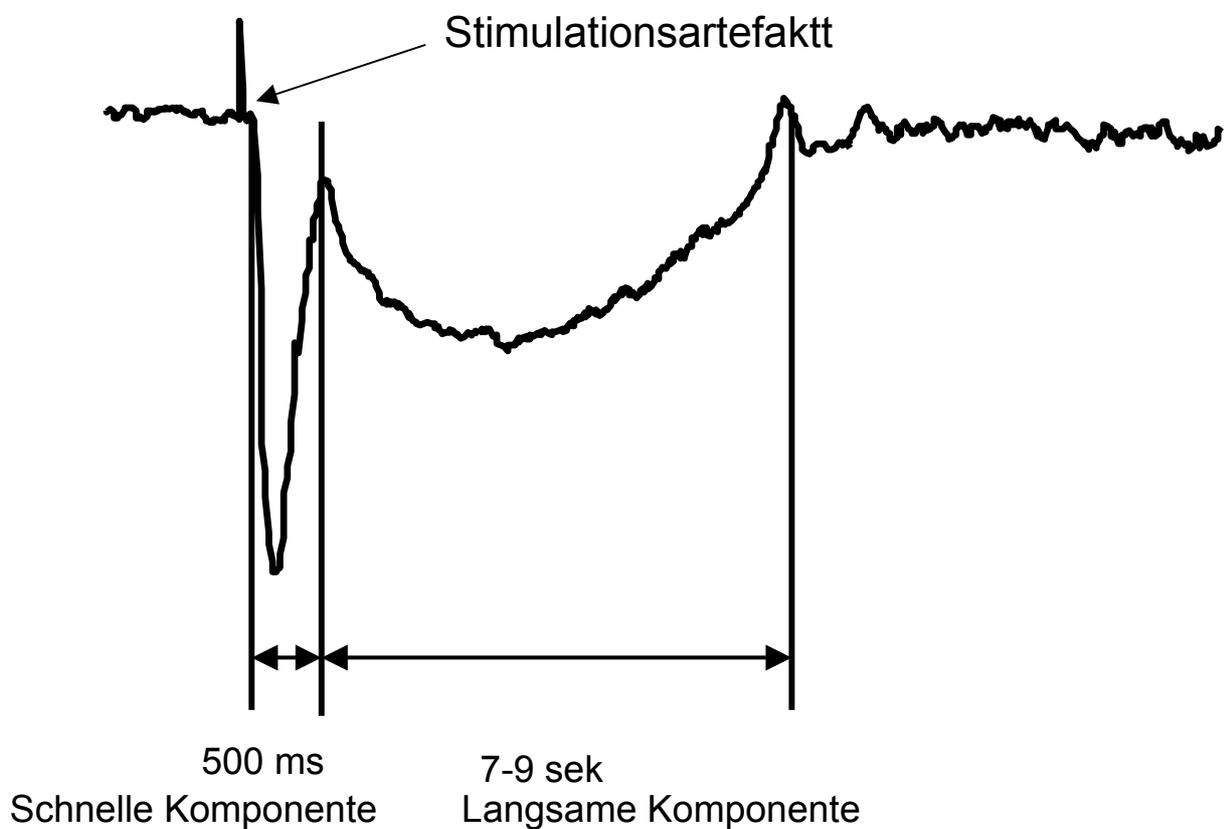


Abbildung 3: Unterteilung des IJPs in zwei Komponenten für Datenerfassung.

### **3.4.2 Quantifizierung der neuronalen Dichte in mit NADPH-Diaphorase und Cuproinic blue gefärbten Präparaten**

Quadrate gleicher Grösse ( $1.43 \text{ mm}^2$ ) von Präparaten gefärbten myenterischen Plexus des Dickdarms (Zökum, proximales Kolon (oral, mittel, aboral antimesenterieell und seitlich) und distales Kolon) wurden digital aufgenommen (Olympus Digital Kamera mit 3.3 Mil. Punkte Auflösung, gekoppelt mit Zeiss Axioplan Mikroskop). Alle gefärbten Neurone wurden mit Hilfe eines geeigneten Programms (GrDigit) in jeder Aufnahme markiert, gezählt und die Anzahl von Neuronen pro  $1 \text{ mm}^2$  ermittelt. Nach der Bestimmung der Ganglienanzahl in demselben Präparat wurde die Anzahl von Neuronen pro Ganglion berechnet.

Für die morphometrische Bestimmung des Umfangs eines Segments in einem bestimmten Darmabschnitt wurden an makroskopischen Aufnahmen von Zirkumferenz-erhaltenden 3D Präparaten (Olympus Digitale Kamera mit Makrokonverter Vorsatz  $f=40 \text{ cm}$ ) der Durchmesser des Segments gemessen. Die Neuronenanzahl pro Segment wurde folgendermassen berechnet: Multiplizierung des Umfangs eines Segments (in mm) mit der Anzahl von Neuronen pro  $\text{mm}^2$ , was die absolute Zahl von Neuronen pro Segment mit 1 mm Länge ergab.

### **3.5 Statistik**

Alle elektrophysiologischen und morphologischen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die Statistik wurde mit dem Softwareprogramm Sigma-Stat (Jandel, San Rafael, CA) durchgeführt. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde die Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen und der Student-t-Test für gepaarte und ungepaarte Stichproben verwendet. Als Signifikanzniveau wurde eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  festgelegt. "n" gibt die Zahl der durchgeführten Versuche an Geweben der verschiedenen Tiere wieder.

### 3.6 Verwendete Substanzen

Die folgenden Substanzen fanden Verwendung: Atropin, Apamin, Ammonium molybdat, Guanethidin, N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin, Nifedipin, Triton X-100, TTX, Tris-Base (Sigma, München, Germany); (NADPH (reduzierte Form), Nitroblue Tetrazolium (Fluka, München, Germany); Cuproline blue (Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA), DePeX (Serva, Heidelberg, Germany); Sylgard (Dawn Corning, USA), Liquid Paraffin, (Merck, München, Germany) Methylenblau (Neopharma Aschau i. Chiemgau, Germany).

Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst, bei -20° C gelagert, unmittelbar vor dem Gebrauch aufgetaut und in KRP weiterverdünnt.

### 3.7 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Antivibrationstisch.

Perfusion Pumpe: Kwik Pump (World Precision Instruments, USA)

Mikroelektrode puller Model P-97 mit 3 mm breitem Filament (Sutter Instrument, USA)

Stimulus Isolation Unit Grass SIU59 (Grass, Quincy, Mass., USA)

Stimulator Grass S11 (Grass, Quincy, Mass., USA)

Mikromanipulatoren: Narashigae (World Precision Instruments)

Borosilicat Glas Kapillare, 1.0 mm OD x 0.58 mm ID (Clark Electromedical Instruments)

Mikroelektrode Verstärker DUO 733 (National Instruments USA),

Analog-to-digital Wandler, SCB 68 Interface (National Instruments USA)

Registrierungsprogramm LABVIEW 5.0 (National Instruments USA)

Mikroskop Olympus SZ-600 (Olympus, Hamburg, Deutschland)

Mikroskop Axioplan (Karl Zeiss, Jena, Deutschland)

Digital Kamera Camedia C 3030 von Olympus mit 3.3 Megapixel. (Olympus, Hamburg, Deutschland)

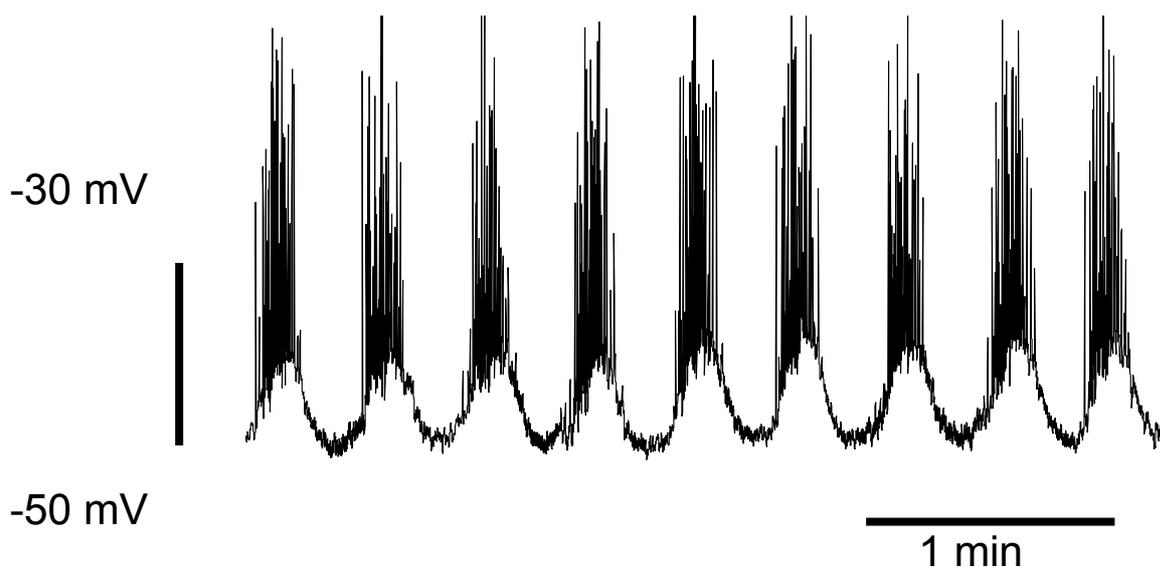
Kaltlichtquellen Olympus (Olympus, Hamburg, Deutschland)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des proximalen Kolon

#### 4.1.1 Basalaktivität

Das proximale Kolon zeigte spontane elektrische Aktivität, die nach 30 Minuten Inkubationszeit im Organenbad auftrat und aus langsamen elektrischen Schwingungen des Membranpotentials mit überlagerten Aktionspotentialen bestand. Diese traten mit einer mittleren Frequenz von 2.3 /min auf. Das durchschnittliche RMP der GM aus ZM bei Perfusion mit normalem KRP war  $-52.8 \pm 1.8$  mV (n =8) (s. Abb.4).



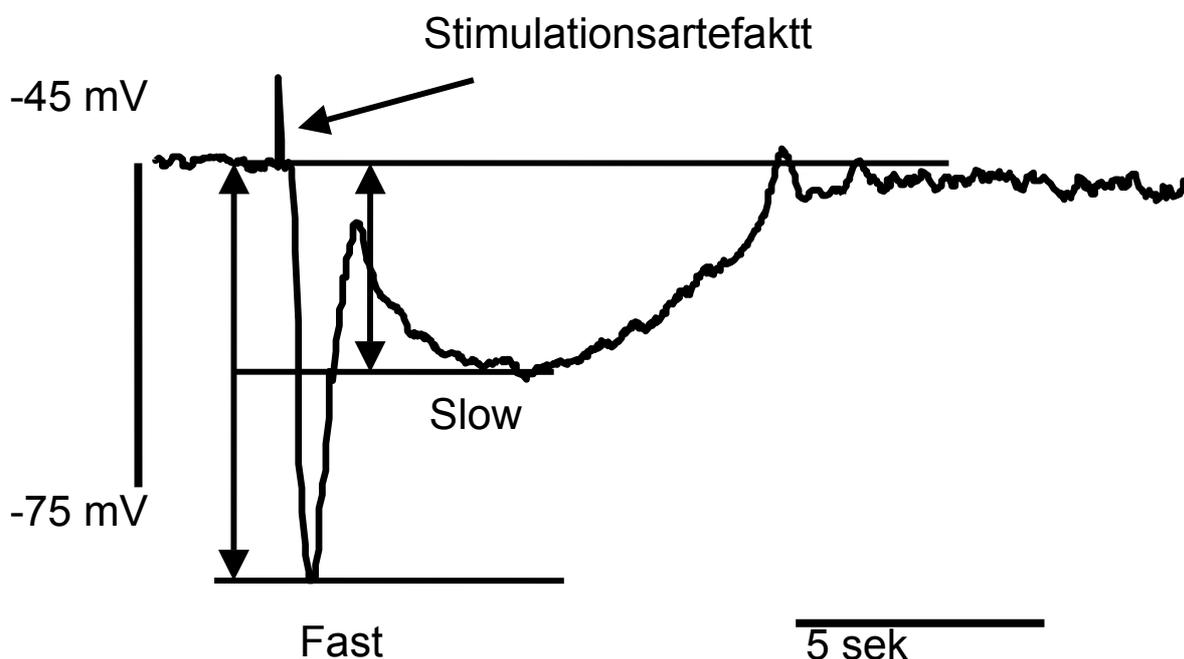
**Abbildung 4: Spontan-generierte Aktionspotentiale in ZM.**

#### 4.1.2 Versuche unter NANC-Bedingungen

In allen Versuchen zur Untersuchung der nicht-adrenergen-nicht-cholinergen Innervation wurde Nifedipin, Atropin und Guanethidin (je 1  $\mu$ M) der Perfusionslösung hinzugefügt, um Muskelkontraktionen, spontane Aktivität und Einflüsse der cholinergen und adrenergen Innervation zu verhindern. In Abwesenheit anderer Substanzen wiesen die glatte Muskelzellen des ZM unter diesen Bedingungen ein stabiles RMP auf ( $-46.1 \pm 2.3$  mV n=17).

### 4.1.3 Einfluss von elektrischer Feldstimulation.

Wie bereits beschrieben, wurde über zwei Platinstimulationselektroden, die senkrecht zur zirkulären Muskelschicht plaziert wurden, das aus der Tunica muscularis mit dem intakten myenterischen Plexus bestehende Präparat durch Erzeugung eines elektrischen Feldes stimuliert. Die elektrische Feldstimulation (EFS) führte über eine Erregung intramuraler Neurone zur Entstehung von IJPs, die im proximalen Kolon aus zwei Komponenten bestand. Das erste Maximum war Teil der schnellen Komponente ("Fast", innerhalb von 800 ms nach dem Stimulus, mit einer mittleren Hyperpolarizationsamplitude von  $28.5 \pm 4.1$  mV,  $n=10$ ) und einer darauffolgenden zweiten, langsamen Komponente ("Slow", ab 6 s nach dem Stimulus, mit einer mittleren Hyperpolarizationsamplitude von  $13.6 \pm 2.0$  mV,  $n=10$ ). Die Antwort des Membranpotentials auf EFS unter NANC Bedingungen ist in Abb. 5 wiedergegeben.



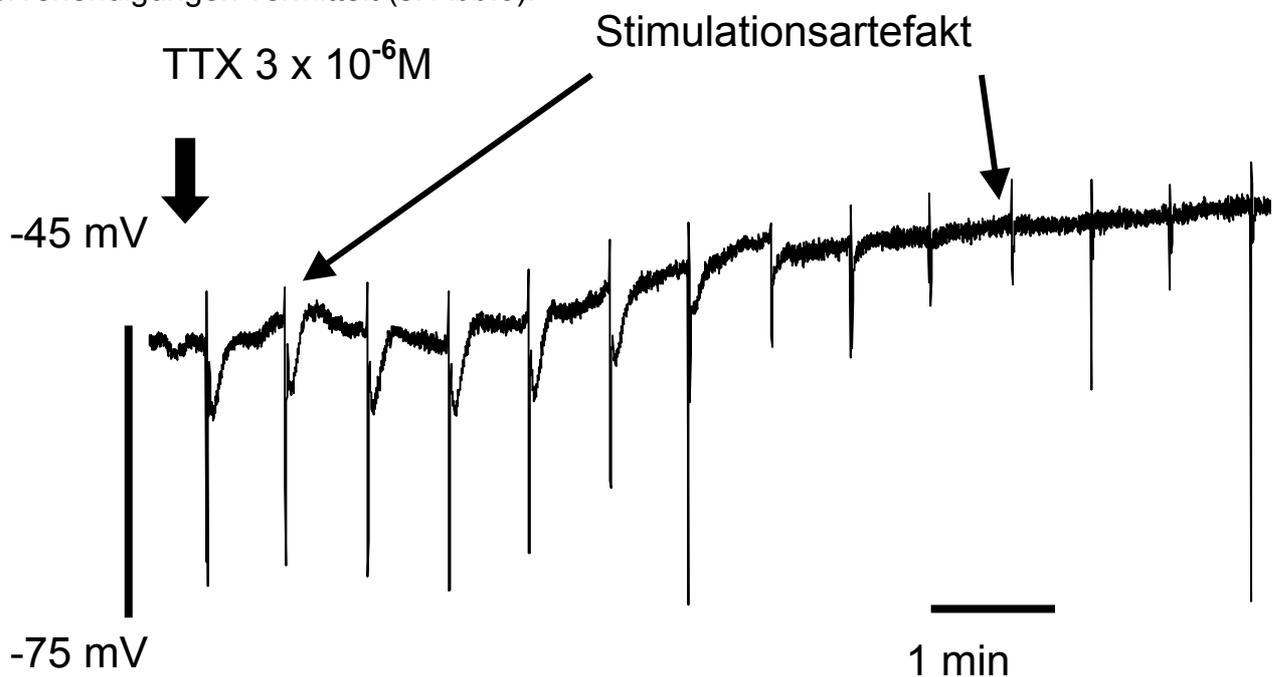
**Abbildung 5: Repräsentative Aufzeichnung der Membranpotentialänderung nach EFS. Die Stimulation intrinsischer inhibitorischer Nerven durch EFS löst ein inhibitorisches Junctionspotential (IJP) in Zellen der zirkulären Muskelschicht aus, das aus einer schnellen und langsamen Komponente besteht.**

## Pharmakologische Charakterisierung

### 4.1.4 Einfluss von Tetrodotoxin (TTX)

Das vom Kugelfisch isolierte Neurotoxin TTX ist ein selektiver Blocker der schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle, der die Fortleitung der Aktionspotentiale von Nervenzellen verhindert. Die Wirkung beruht auf einer positiven Guanidingruppe des Giftes, das die Öffnung der Pore des Natriumkanals von der extrazellulären Seite blockiert und somit Natrium nicht mehr in die Zelle gelangen lässt (Hafemann, 1971). Tetrodotoxin wird zur Unterscheidung von neuronal und nicht neuronal vermittelten Effekten verwendet.

Die Zugabe von TTX ( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) über 10 min Inkubationszeit führte zur signifikanten Membrandepolarization  $11.2 \pm 1.5 \text{ mV}$  ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ). Die durch EFS ausgelöste IJPs waren durch TTX vollständig geblockt. IJPs werden also unter den verwendeten Versuchsbedingungen (einzelne Stimuli, 0.03 Hz, 0.3 ms Dauer, 15 V) neuronal über eine aktionspotentialabhängigen Freisetzung von Neurotransmittern aus Nervenendigungen vermittelt (s. Abb.6).

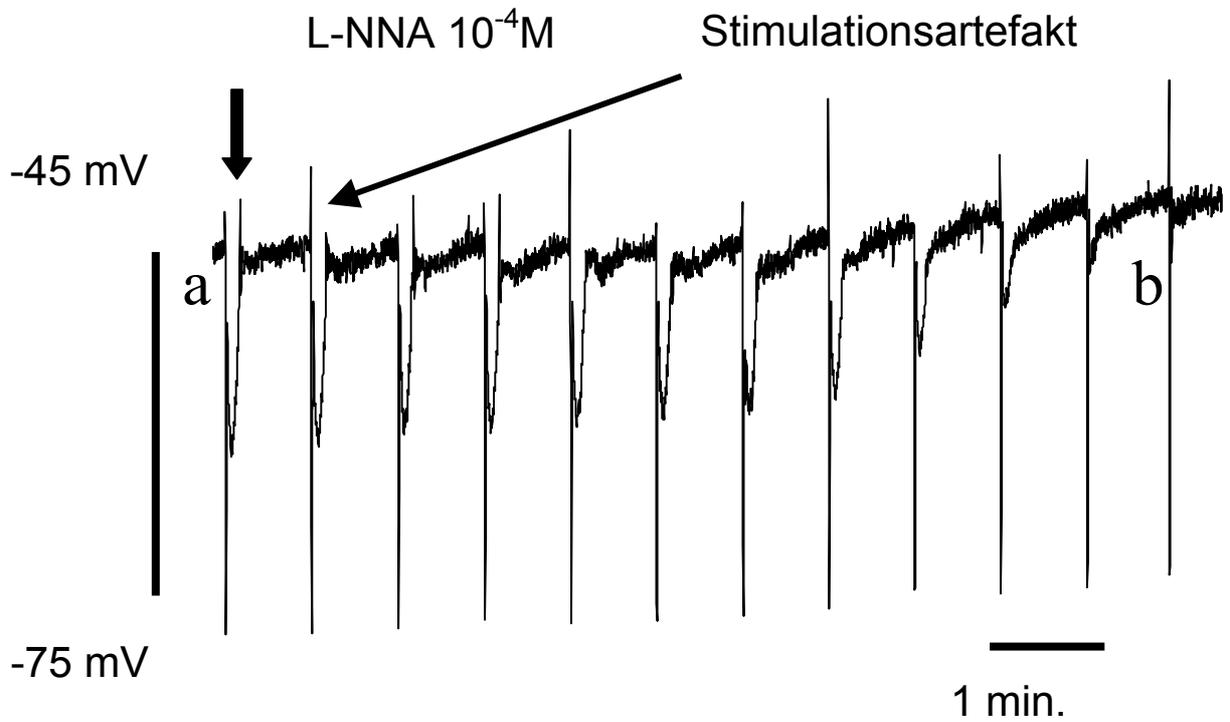


**Abbildung 6:** Die durch EFS ausgelöste IJPs waren TTX ( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) sensitiv, was eine neuronale Übertragung beweist.

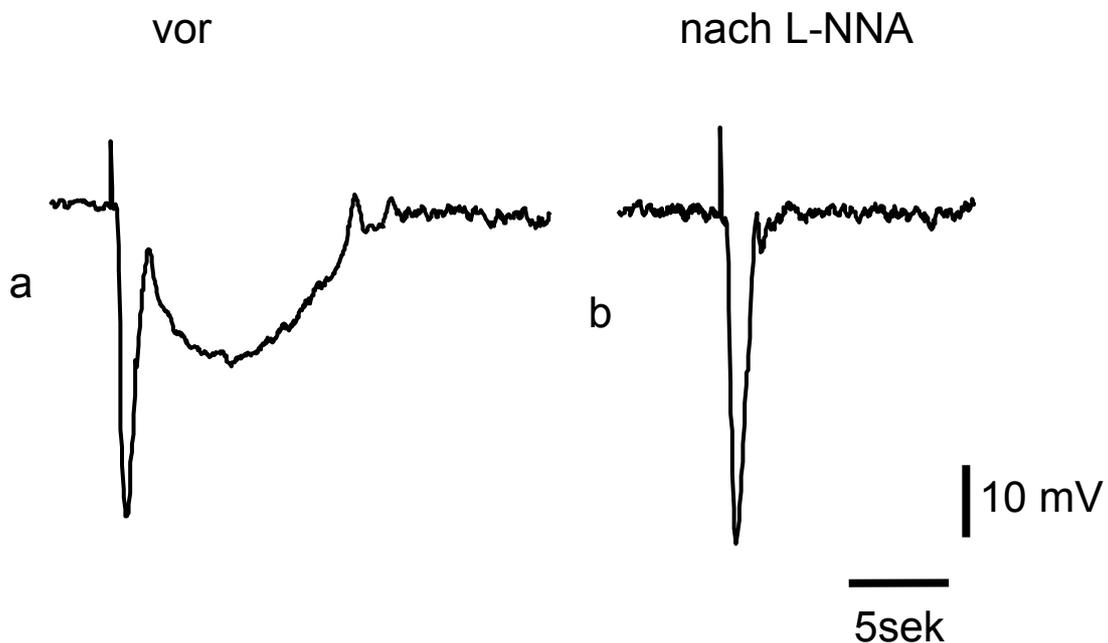
#### 4.1.5 Einfluss von N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin (L-NNA)

Eine Vielfalt von Substanzen ist für die inhibitorische Neurotransmission zum Muskel im Gastrointestinaltrakt postuliert worden. Diese umfassen ATP (Burnstock *et al.*, 1970), NO (Boeckxstaens & Pelckmans, 1997), VIP (Murr *et al.*, 1999) und PACAP (Zagorodnyuk *et al.*, 1996). NO kann als inhibitorischer wirksamer Neurotransmitter sowohl zur LM als auch zur ZM wirken (Smith & Robertson, 1998). Exogenes NO kann aber auch zur Muskelkontraktion der LM durch die Freisetzung von ACh führen (Rae *et al.*, 1998). L-NNA ( $10^{-4}$  M) ist ein kompetitiver und reversibler Blocker der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), die durch Abspaltung aus L-Arginin NO freigesetzt.

Die blockierende Wirkung von L-NNA trat innerhalb von 6 Minuten nach Anwendung der Substanz auf. L-NNA bewirkte eine Membrandepolarization ( $7.3 \pm 3.8$  mV, n=9) und eine vollständige Hemmung der durch EFS ausgelösten langsamen Komponente des IJPs (s. Abb.7), hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die schnelle Komponente ( $25.0 \pm 8.7$  mV vs.  $29.0 \pm 9.5$  mV, n=12, n.s.). Dies zeigt, dass die langsame Komponente der IJPs durch Freisetzung des Stickstoffmonoxid (NO) als Neurotransmitter vermittelt wird (s. Abb.7 und Abb.8).



**Abbildung 7: L-NNA ( $1 \times 10^{-4}$ M), ein Blocker der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) nach 10 Minuten Anwendung eine leichte Depolarization ( $7.3 \pm 3.8$  mV,  $n=9$ ) Membranpotentials und hemmt die langsame Komponente des IJP in Zellen der zirkulären Muskelschicht im proximalen Kolon (s. Abb. 6 mit vergrößerter Zeitskala).**



**Abbildung 8: Wirkung von L-NNA ( $1 \times 10^{-4}$ M) auf die schnelle und langsame Komponente des IJP. L-NNA blockt die langsame Komponente vollständig hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die schnelle Komponente ( $25.0 \pm 8.7$  mV vs.  $29.0 \pm 9.5$  mV,  $n=12$ , n.s.).**

#### 4.1.6 Einfluss von Apamin

Apamin ist ein aus Bienengift isoliertes Toxin, das als Inhibitor der sogenannten "small conductance"  $\text{Ca}^{++}$  abhängigen Kaliumkanälen wirkt (Blatz & Magleby, 1986). Es ist benutzt worden, um die zwei Phasen von IJPs zu der LM und ZM des Dünn - und Dickdarmes zu unterscheiden (Bridgewater *et al.*, 1995). Es reduziert der schnelle Komponente des IJP in dem ZM vom Meeresschweine Ileums und Kolons.

Auf die durch EFS ausgelösten IJPs hatte Apamin signifikanten Einfluss. Apamin ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) reduzierte sowohl die schnelle ( $25.0 \pm 8.7 \text{ mV}$  vs.  $16.0 \pm 9.5 \text{ mV}$ ,  $n=7$   $p < 0.05$ ) als auch die langsame Komponente ( $13.6 \pm 2.0 \text{ mV}$  vs.  $8. \pm 1.5 \text{ mV}$ ,  $n=7$   $p < 0.05$ ) des EFS-induzierten IJPs. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Apamin-sensitive  $\text{K}^{+}$ -Kanäle sowohl an der schnellen als auch an der langsamen Komponente beteiligt sind (s.Abb. 9 und Abb.10).

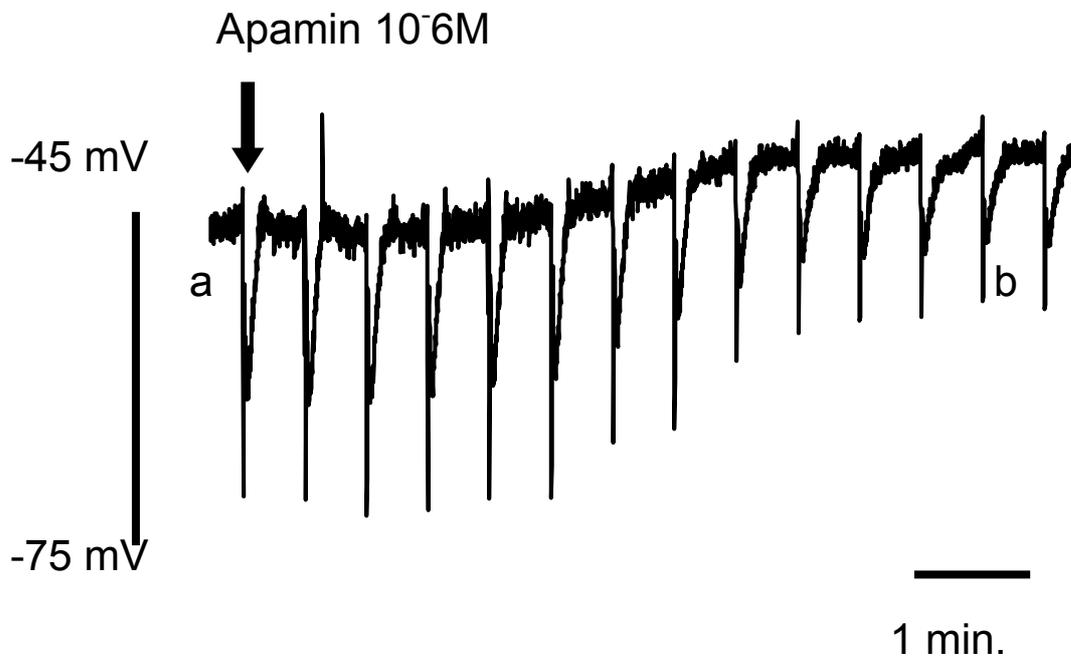


Abbildung 9: Apamin ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ), ein Blocker der kalziumabhängigen Kaliumkanäle reduziert die schnelle Komponente des IJP in Zellen der zirkulären Muskelschicht im proximalen Kolon.

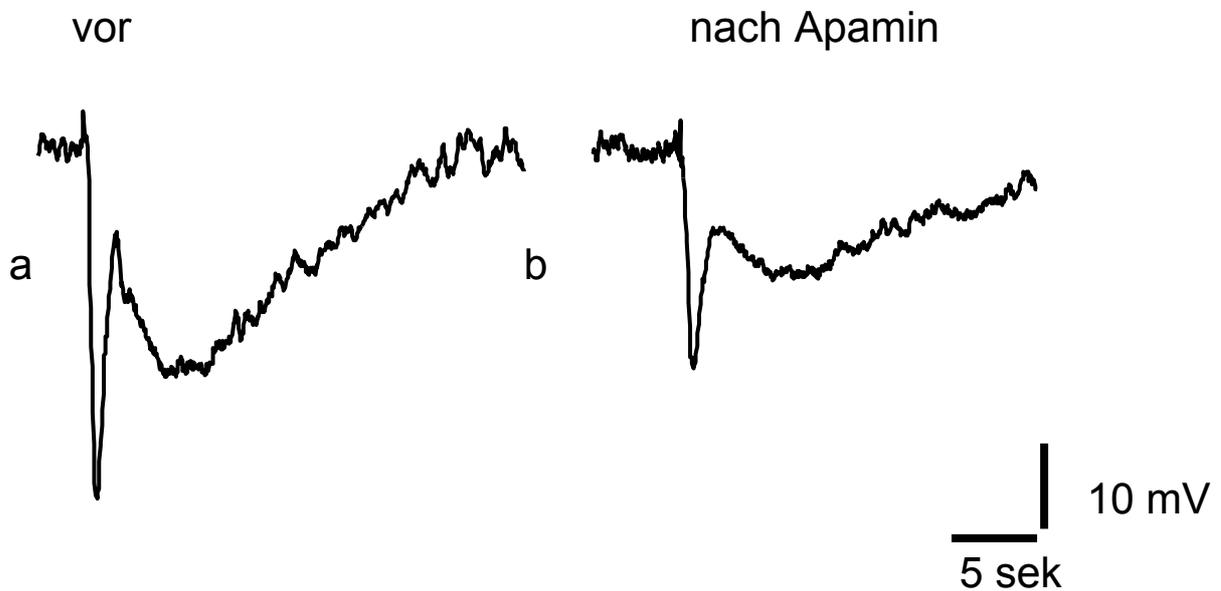


Abbildung 10: Wirkung von Apamin ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) auf schnelle und langsame Komponenten IJPs.

## **4.2 Regionale Unterschiede der elektrophysiologischen Eigenschaften im Dickdarm der Maus.**

### **4.2.1 Ruhemembranpotential.**

In allen Versuchen wurde Nifedipin ( $10^{-6}$  M) der Perfusionslösung hinzugefügt, um Muskelkontraktionen zu verhindern. In Abwesenheit anderer Substanzen wiesen die glatten Muskelzellen der ZM ein stabiles RMP auf, wobei das RMP im Zökum signifikant niedriger war als im proximalen oder distalen Kolon, welche nicht signifikant unterschiedlich waren ( $-56.7 \pm 6.9$  mV im Zökum (n=13);  $-46.1 \pm 2.3$  mV im proximalen Kolon (n=7);  $-46.4 \pm 3.8$  mV im distalen Kolon (n=11)  $p < 0.05$ ).

### **4.2.2 Elektrische Feldstimulation**

Die Stimulation intrinsischer inhibitorischer Nerven löste TTX-sensitive IJPs in Zellen der zirkulären Muskelschicht in allen untersuchten Präparaten aus, die sich in Grösse und Form entlang der Längsachse des Kolon veränderten.

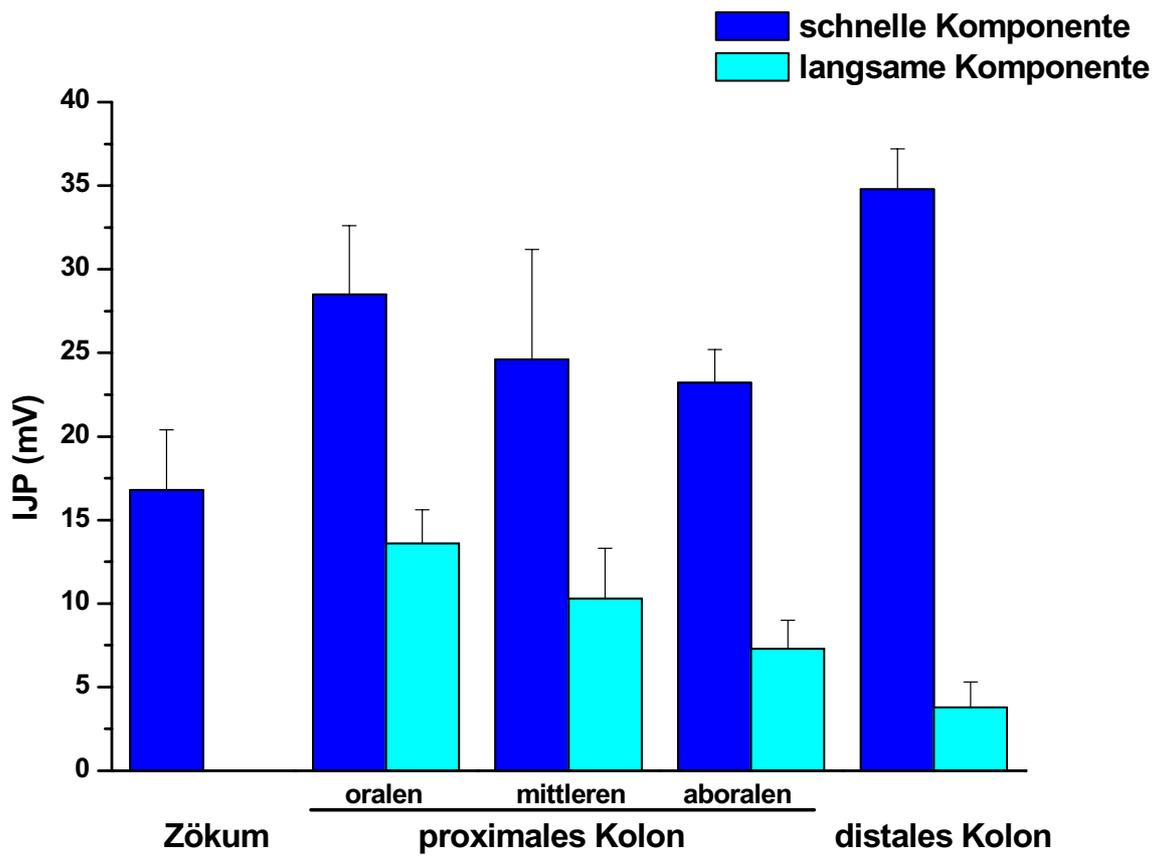
Im Zökum ergab die EFS (einzelne Stimuli) monophasische IJPs von kurzer Dauer ( $918 \pm 200$  ms mit einer Amplitude von  $16.8 \pm 3.6$  mV, n=6), die nur aus einer schnellen Komponente bestanden und von L-NNA nicht beeinflusst wurden. Im oralen, mittleren und aboralen proximalen Kolon und im distalen Kolon erzeugten einzelne Stimuli IJPs, die aus einer L-NNA-insensitiven schnellen Komponente und einer L-NNA-sensitiven langsamen Komponente bestanden. Die initiale schnelle Komponente war von einer raschen (Dauer  $729 \pm 33$  ms) Hyperpolarization charakterisiert, die aber nicht signifikant in Amplitude innerhalb des proximalen Kolon ( $28.5 \pm 4.1$  mV  $24.6 \pm 6.6$  mV und  $23.2 \pm 2.0$  mV in oralen, mittleren und distalen proximalen Kolon, jeweils n=10 n.s.), variierte. Im Gegensatz dazu war die schnelle Komponente im distalen Kolon signifikant breiter und grösser (Dauer  $1099 \pm 67$  ms,  $34.8 \pm 2.4$  mV n=10) (s. Tab 1).

Die zweite, "langsame" Komponente (Dauer 6-10 Sek) zeigte auch Unterschiede zwischen proximalem und distalem Kolon und wies sogar Unterschiede innerhalb eines kurzen Segments des proximalen Kolons auf. Auch die Grösse der langsamen Komponente war in allen Regionen signifikant unterschiedlich ( $p < 0.05$ , n=10) (s. Abb.11 und Abb 12).

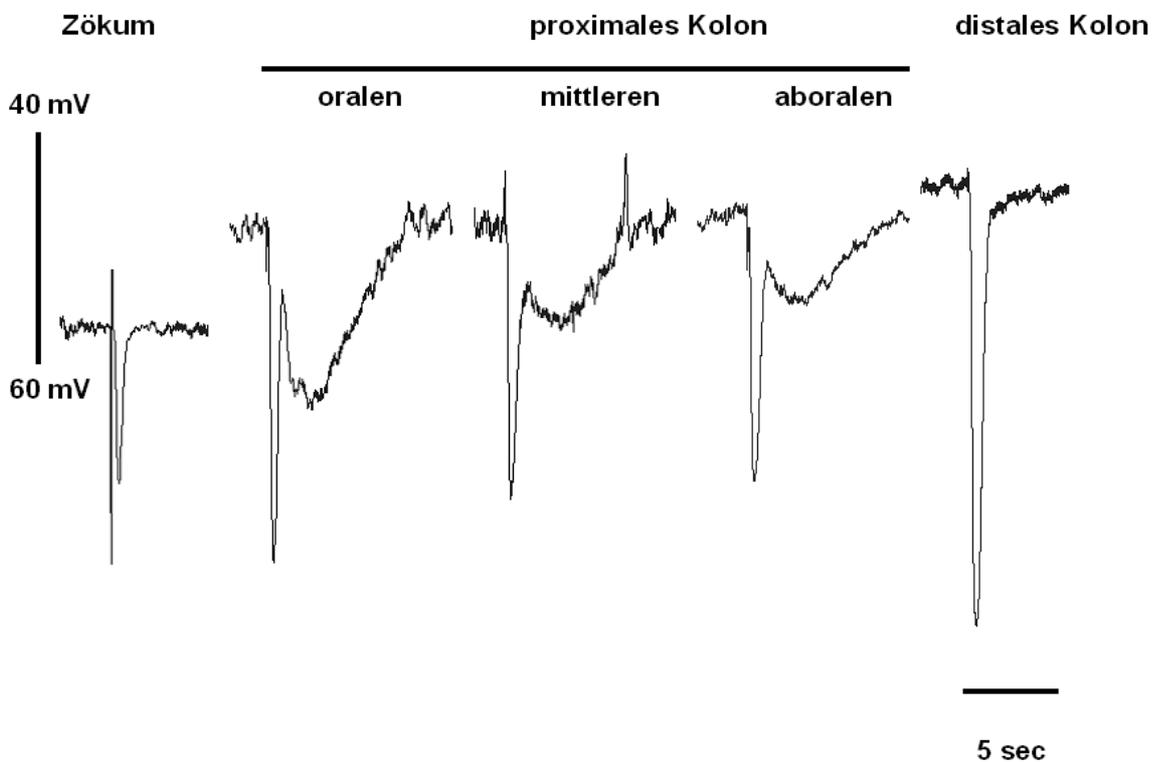
Um zu überprüfen, ob mit starkem Stimulationsreiz sich die IJPs weiter veränderten, wurden zusätzlich Stimulationsversuche mit 1 bzw. 5 Hz Stimulationsfrequenz mit 10 Pulse durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich im Zökum keine langsame Komponente des IJPs (s. Abb. 15). In den anderen Kolonabschnitten bewirkten die stärkeren Stimulationsparameter IJPs mit grösseren Amplituden und längerer Dauer, die jedoch weiterhin eine deutliche Abnahme von proximal nach distal aufwiesen (s. Abb.14 und Abb.13).

**Tabelle 1: Dauer und Amplitude von schnelle und langsame Komponenten von IJP bei Stimulation mit Einzelimpuls zeigt ausgeprägte regionale Unterschied in der inhibitorische Neuroübertragung in ZM von Zökum, proximalen und distalen Kolon.**

		schnelle Komponente		langsame Komponente	
		Dauer ms	Amplitude mV	Dauer s	Amplitude mV
Zökum		918±20*	16.8±3.6 n.s.	Keine	Keine
Proximales Kolon	oralen	729±33	28.5±4.1 n.s.	7.0±1.4	13.6±2.0***
	mittleren	729±33	24.6±6.6	7.0±1.4	10.3±3.0***
	aboralen	729±33	23.2±2.0	7.0±1.4	7.3±1.7 ***
distales Kolon		1099±67*	34.8±2.4	3.1±0.6	3.8±1.5 ***



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung der Amplituden der schnellen und langsamen Komponenten des IJPs (mV) bei Stimulation mit Einzelimpuls in der ZM abgeleitet von verschiedenen Abschnitten entlang der Längsachse des Kolons.



**Abbildung 12: Die langsame Komponente von IJPs bei Stimulation mit Einzelimpuls war maximal im oralen proximalen Kolon und nahm nach aboral hin ab ( $13.6 \pm 2.0$  mV,  $10.3 \pm 3.0$  mV,  $7.3 \pm 1.7$  and  $3.8 \pm 1.5$  mV für orales bzw. mittleres, aborales proximales Kolon und distales Kolon,  $n=6$ ,  $p<0.05$ ). Im Zökum ergab EFS monophasische IJPs.**

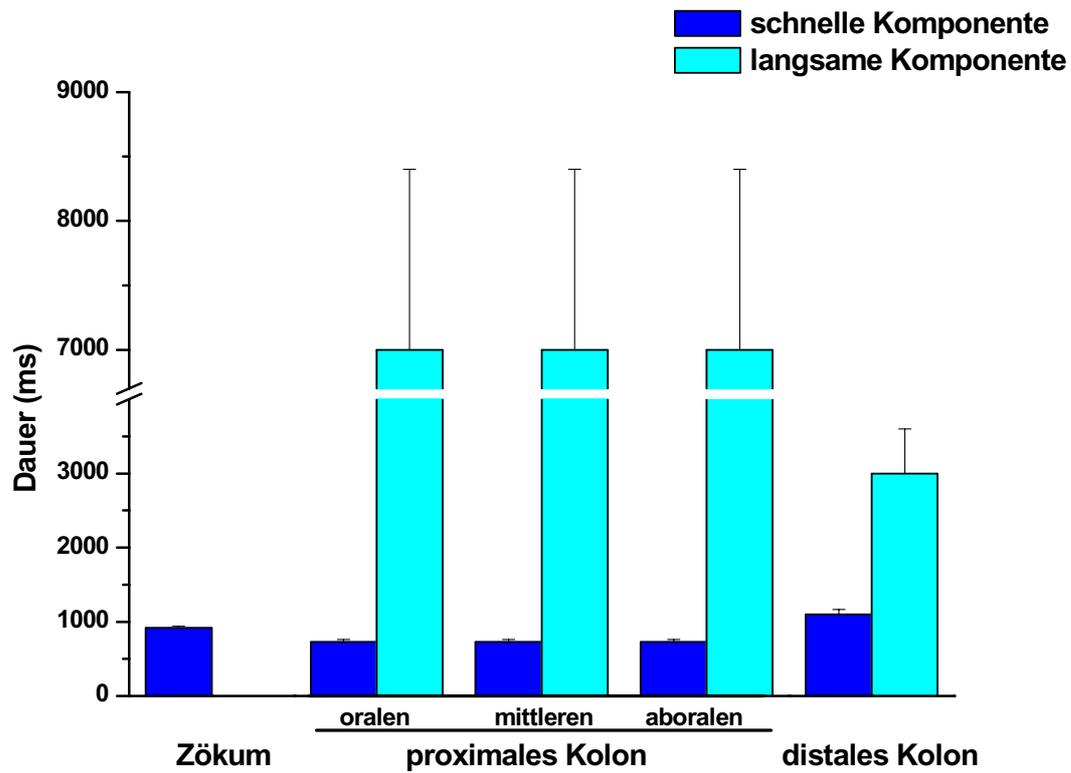
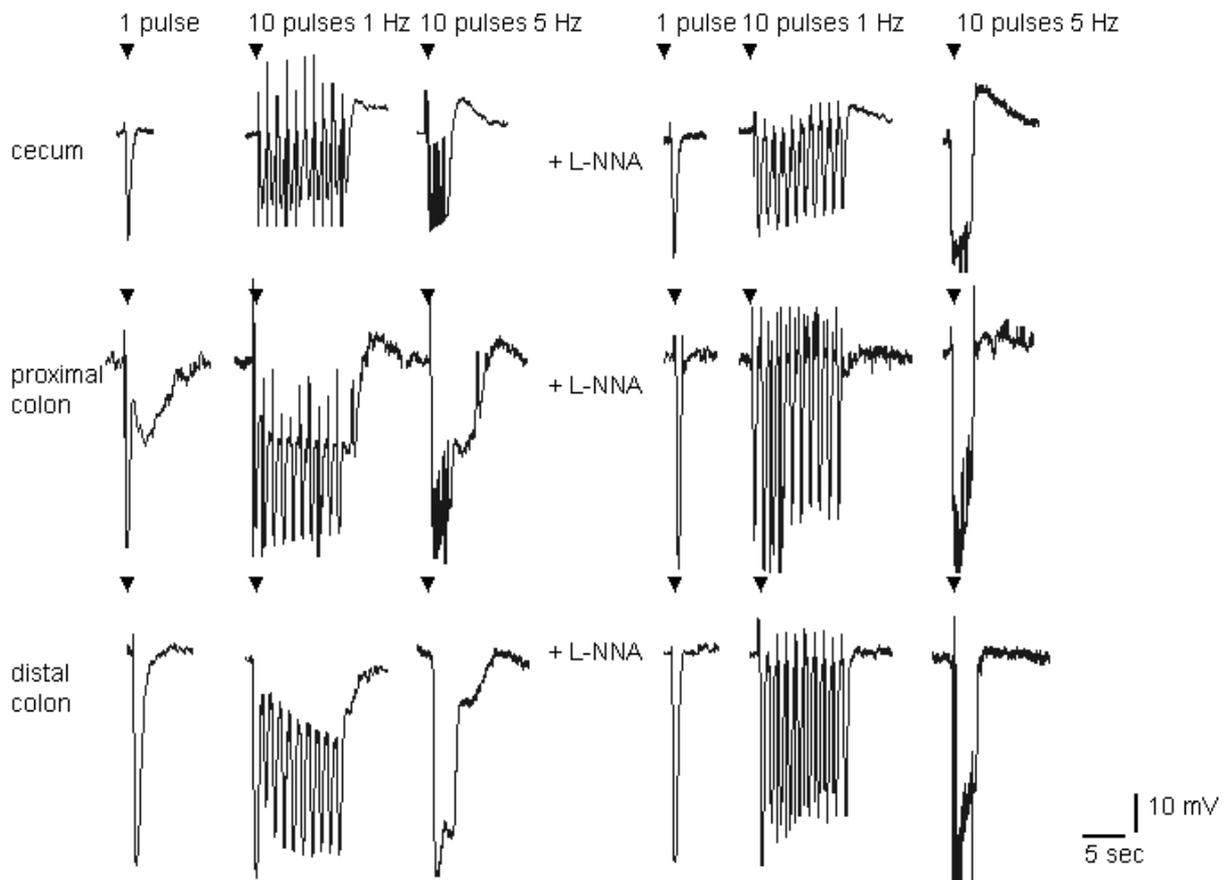


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Dauer der schnellen und langsamen Komponente der IJPs (ms) bei Stimulation mit Einzelimpuls, abgeleitet in Zökum, proximalem und distalem Kolon.



**Abbildung 14: Stimulation intrinsischer Nerven löste TTX-sensitive IJPs in Zellen der zirkulären Muskelschicht aus. Im Zökum ergab EFS auch mit 1 Hz (10 Pulse) und 5 Hz (10 Pulse) nur monophasische IJPs, die von L-NNA nicht beeinflusst wurden. Im proximalen und distal Kolon löste EFS IJPs aus, die aus einer L-NNA-insensitiven schnellen Komponente und einer L-NNA-sensitiven langsamen Komponente bestehen.**

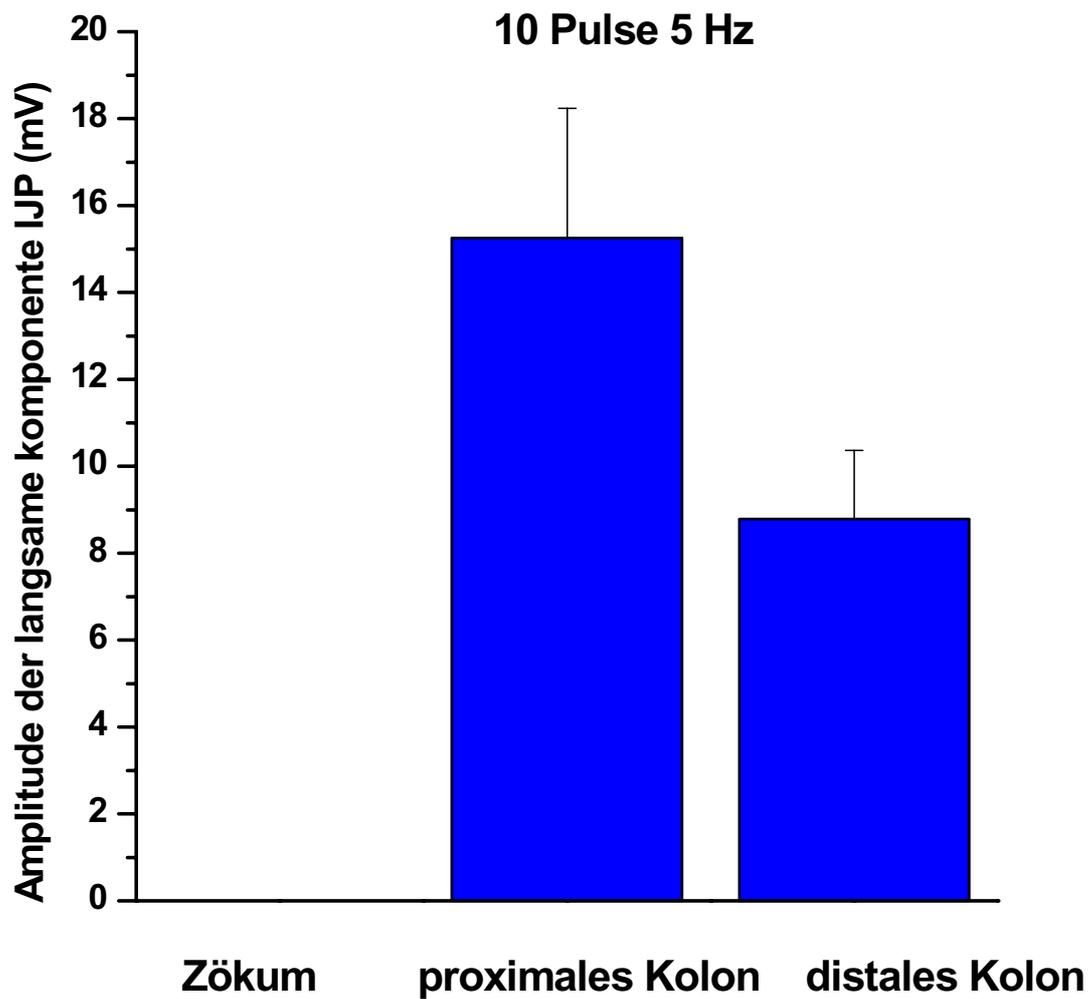


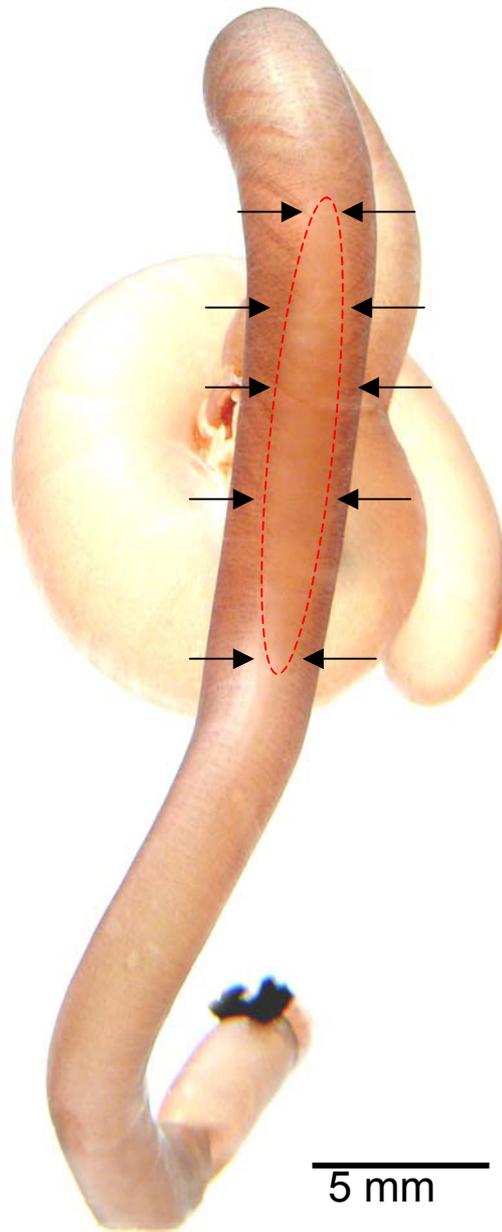
Abbildung 15: Graphische Darstellung der maximalen Amplitude der langsamen IJP-Komponente im Zökum, proximalem und distalem Kolon bei hoher Stimulationsintensität (10 Pulse mit 5Hz).

### **4.3 Histologische und histochemische Charakterisierung des Plexus myentericus Dickdarm der Maus.**

#### **4.3.1 NADPH-Diaphorase Histochemie**

Die Präparation von "Whole mounts" erleichtert die zweidimensionale Darstellung des Netzwerks von Nervenbündeln des MP, welcher sich aus einem primären, einem sekundären, und einem tertiären Plexus zusammensetzt (Gabella, 1979). Zur Darstellung kamen myenterische Ganglien, die durch dicke Faserbündel verbunden waren, was dem primären Plexus entsprach. Zwischen den dicken Faserbündeln des Primärplexus kamen dünnere, quer verlaufende Faserbündel zur Darstellung, die dem sekundären Plexus entsprachen. Im Raum zwischen den Nervenbündeln und Ganglien des primären und sekundären Plexus zeigte sich zudem ein dichtes Netzwerk von sehr feinen Nervenfasern, die in ihrer Gesamtheit den tertiären Plexus bildeten. Während die Struktur des tertiären Plexus in allen untersuchten Darmabschnitte unverändert blieb, bestanden erhebliche Unterschiede in Struktur und Dichte des primären und sekundären Plexus verschiedener Darmabschnitte.

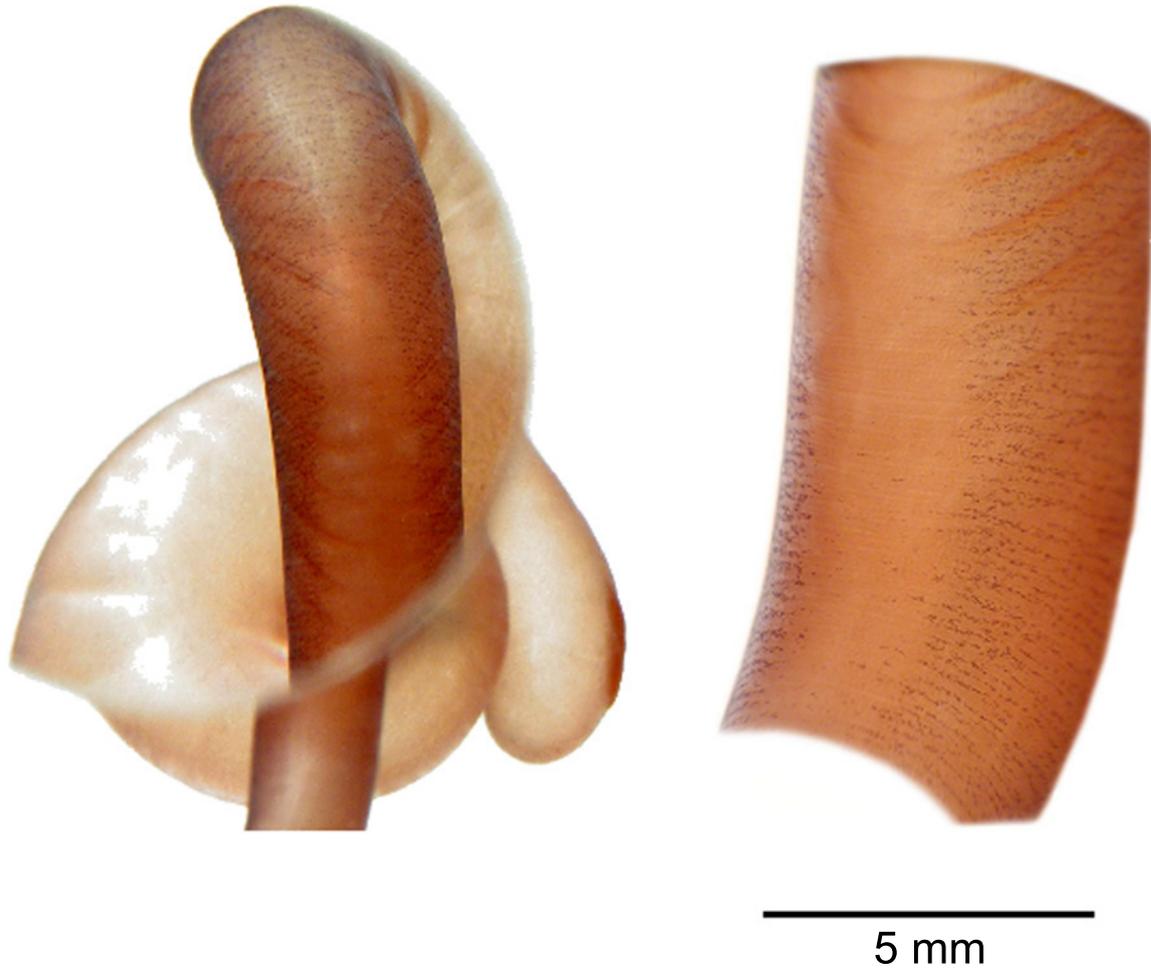
Überraschenderweise zeigte die NADPH-Diaphorase Färbung im Bereich der antimesenterischen Region des proximalen Kolons eine Lücke (3x15 mm) im Netzwerk der neuronalen Ganglien des myenterischen Plexus, während die Nervenfasern des tertiären Plexus komplett erhalten waren (s. Abb. 16; 17; 18).



**Abbildung 16: Die NADPH-Diaphorase Färbung mit 3D- erhaltende anatomische Struktur des enterischen Nervensystems, zeigte im proximalen Kolon eine antimesenterielle (markiert) oligoganglionäre Region (3x15 mm). In diesem Bereich weist das Netzwerk der neuronalen Ganglien im myenterischen Plexus eine Lücke auf, Nervenfasern des tertiären Plexus sind dabei erhalten.**



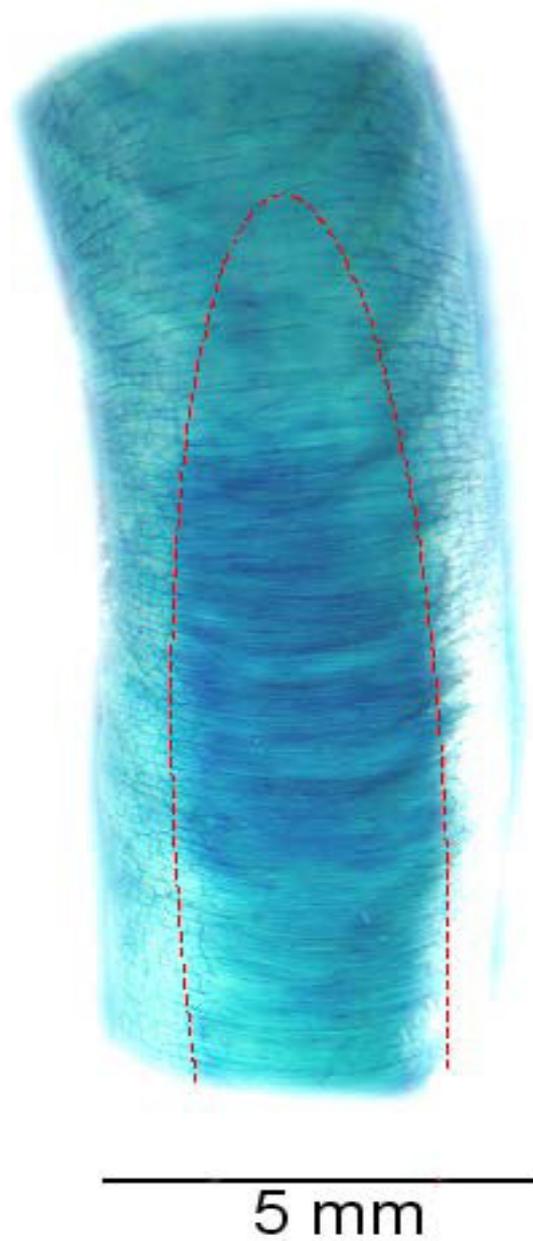
**Abbildung 17: Das gleiche Präparat aus Abb.16, seitlich.**



**Abbildung 18: Detaillierte Aufnahme der gleichen Präparate mit stärkerer Vergrößerung (X9).**

#### **4.3.2 Methylenblau Vitalfärbung.**

Mit der Methylenblau-Vitalfärbung werden Zellkörper und -fortsätze von Neuronen des myenterischen Plexus und auch ICCs gefärbt. Auch bei Anwendung dieser Färbetechnik zeigte sich bei ansonsten komplett erhaltener dreidimensionaler anatomischer Struktur des enterischen Nervensystems im proximalen Kolon die gleiche oligoganglionäre Region wie bei NADPH-Diaphorase Färbung (s. Abb. 19).



**Abbildung 19: Methylenblau Vitalfärbung mit 3D erhaltende anatomische Struktur des enterischen Nervensystems, zeigt im proximalen Kolon die gleiche oligoganglionäre Region (markiert) wie bei NADPH-Diaphorase Färbung.**

### 4.3.3 Cuprolinic blue Färbung

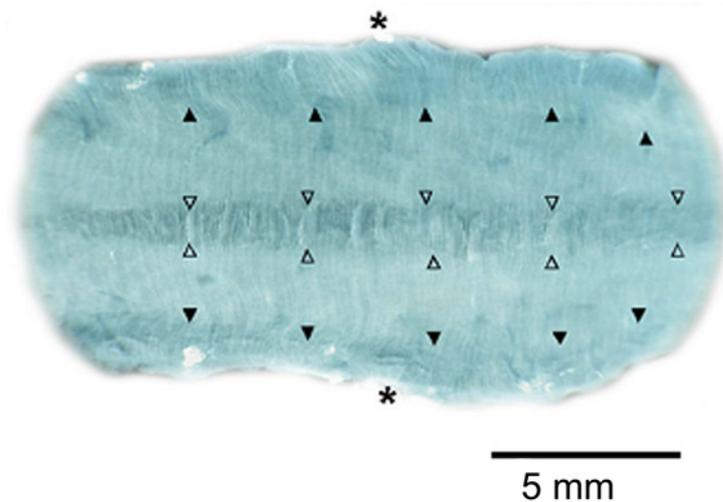
Die Cuprolinic blue Färbung stellt alle Zellsomata des Plexus myentericus dar (Roman *et al.*, 2001). Auch mit dieser Färbetechnik liess sich die in der NADPH-Diaphorase- und in der Methylenblaufärbung beobachtete oligoganglionäre Region nachweisen (s. Abb. 20).



**Abbildung 20: Die Cuprolinic blue Färbung mit 3D erhaltender anatomischer Struktur des enterischen Nervensystems stellt keine neuronalen Zellsomata Strukturen im Bereich der oligoganglionären Region dar.**

#### 4.3.4 Lichtmikroskopie unter seitlicher Belichtung.

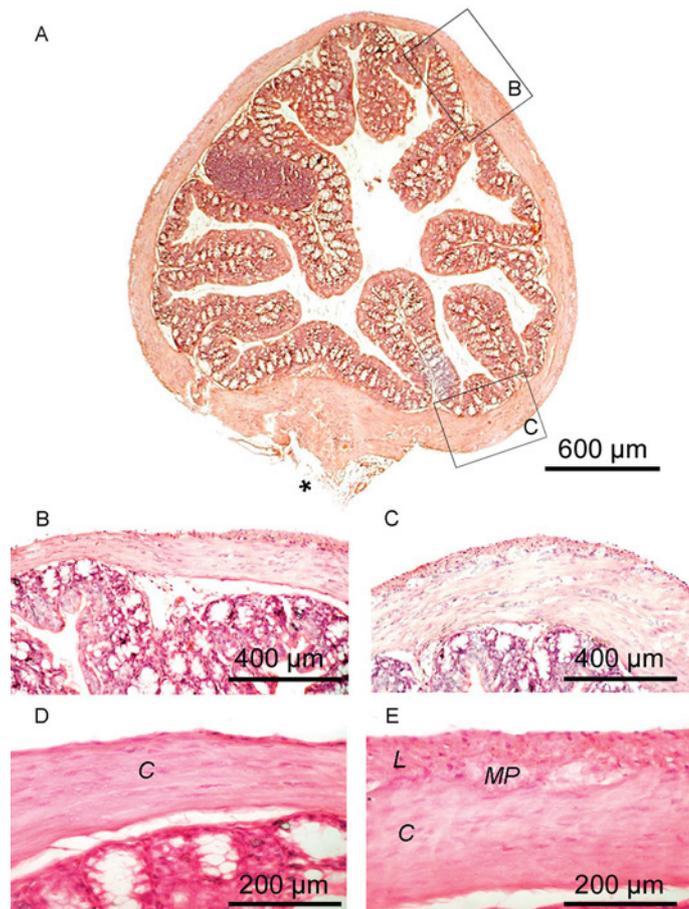
Die Lichtmikroskopie unter seitlicher Belichtung zeigt im proximalen Kolon einen Bereich, in dem die LM auseinander weicht und die darunter liegende ZM sichtbar wird (s. Abb 21).



**Abbildung 21: Diese Abbildung zeigt das Auseinanderweichen der LM. Gefüllte Pfeile weisen auf die mesenterielle - offene auf die antimesenterielle Region. Mesenterieler Rand ist mit Asteriks gekennzeichnet.**

#### 4.3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung (Übersichtsfärbung)

Die durch HE-Färbung dargestellten Schichten der Darmwand zeigten eine fehlende Kontinuität der LM in mesenterischen und antimesenterischen Bereichen nach (s. Abb. 22). In diesen Regionen kamen auch keine Ganglien des MP zur Darstellung.

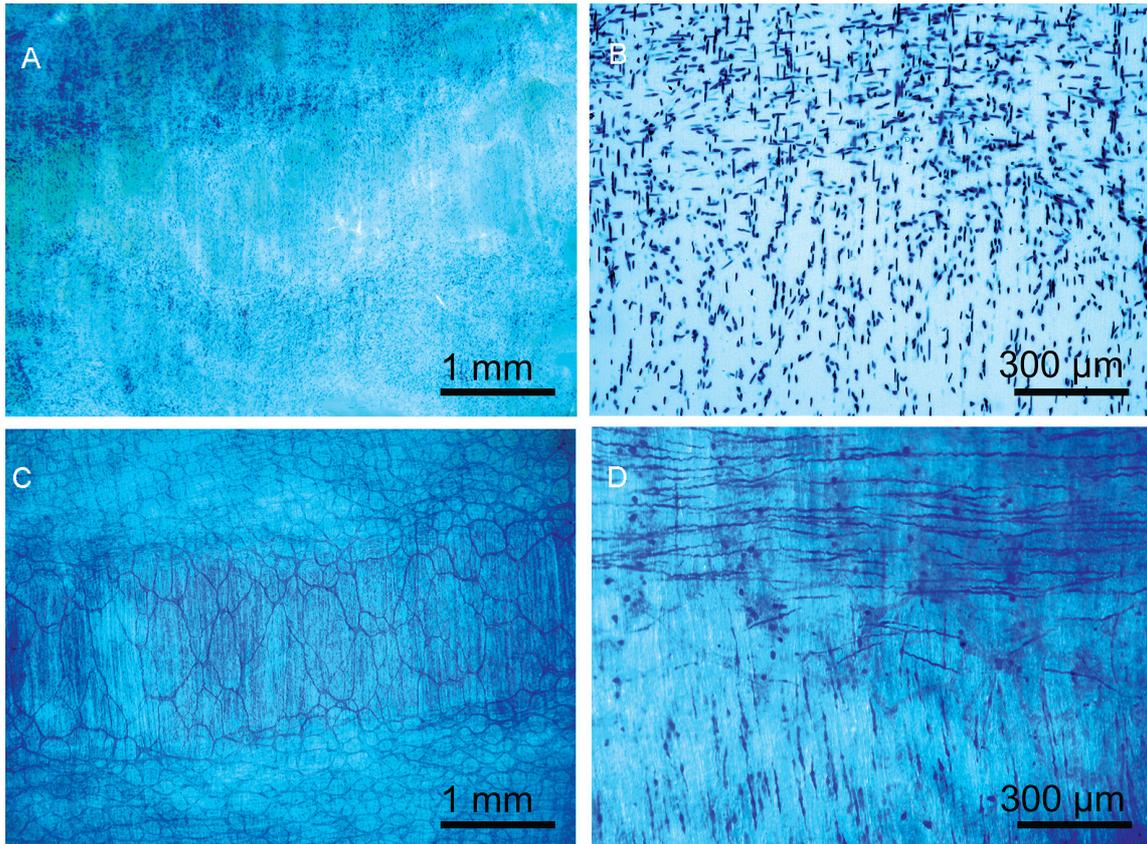


**Abbildung 22: a** Übersicht und Details in mittlerer **b,c** und hoher **d,e** Vergrößerung eines Querschnittes durch das proximale Kolon (Hämatoxylin-Eosin-Färbung). **d,e**: Zwischen zirkulärer (C) und longitudinaler Muskelschicht (L) stellen sich Ganglien des myenterische Plexus (MP) dar, die in den hypoganglionären Regionen **d** fehlen. Die longitudinale Muskelschicht (L) fehlt in den hypoganglionären Regionen antimesenterisch und mesenterisch. In diesen Regionen wird der zirkuläre Muskelschicht (C) nur von Serosa abgedeckt.

#### **4.4 Anatomie der ICC im oligoganglionären Region.**

Um eine mögliche Verteilungsstörung der ICCs nachzuweisen, wurde die ICCs mittels einer histochemischen Reaktion nachgewiesen. Um den etablierten ICC-Marker c-kit zu benutzen zu können, wurden transgene Mäuse ( $\text{Kit}^{\text{W-lacZ}/+}$ ) verwendet, bei denen das lacZ-Gen an Stelle des ersten Exons des c-kit-Gens eingefügt ist. (Vanderwinden *et al.*, 2000), Damit wird die LacZ-Produktion in einem Allel unter Kontrolle des c-Kit-Promotors gestellt, so dass die c-kit-Expression durch die Farbreaktion mit Xgal sichtbar gemacht werden kann.

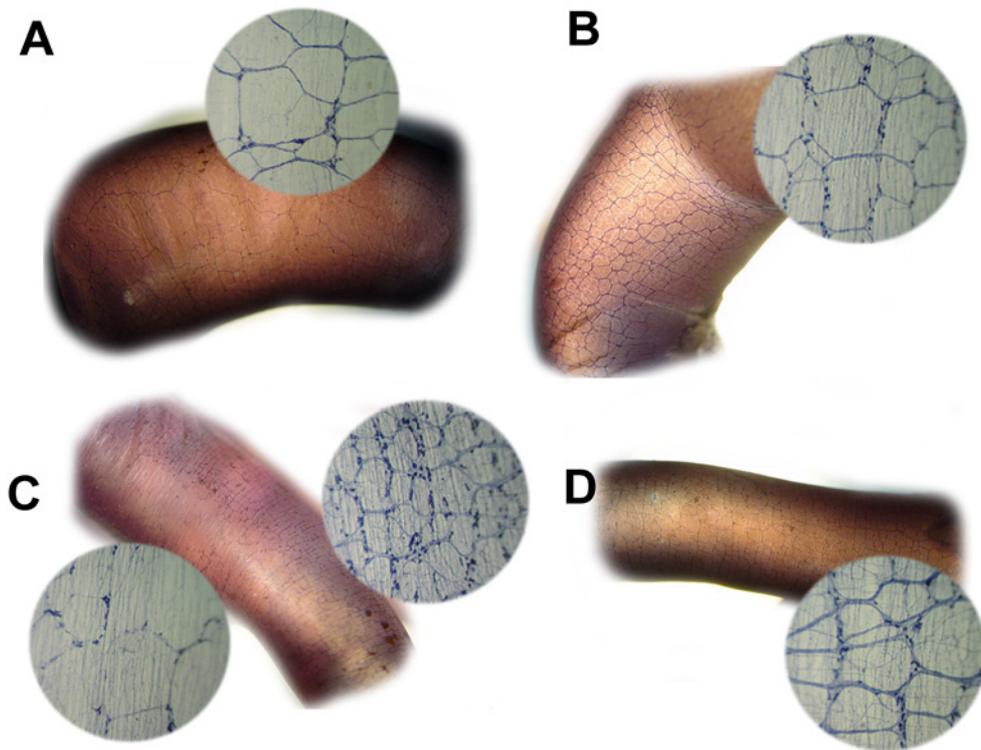
Bei Anwendung dieses Fäbeverfahrens zeigte sich, dass, bei ansonsten normaler Verteilung von ICCs über die gesamte Zirkumferenz der Darmwand in allen Darmabschnitten, im Bereich der oligoganglionären Region keinerlei ICCs zur Darstellung kamen (s. Abb. 23).



**Abbildung 23: Methyleneblau (C und D) und LacZ (A und B) dargestellte Präparate des proximalen Kolon zeigen fehlende ICC-IM.**

#### **4.5 Regionale Unterschiede in Aufbau des enterischen Nervensystem des gesamten Dickdarm der Maus**

Die Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen zeigten eine deutliche Inhomogenität des Aufbaus des myenterischen Plexus im proximalen Kolon der Maus. Aber auch entlang der Längsachse des gesamten Mäusekolons zeigten sich charakteristische Unterschiede (s. Abb. 24). Die neuronale Dichte ist maximal im proximalen Kolon und nimmt sowohl in oraler als auch und in aboraler Richtung ab und zeigt folgendes Verhaltensmuster: proximales Kolon > distales Kolon > Zökum. (s.Tab. 2). Die gesamte Zahl von Neuronen gefärbt mit Cuproinic blue verteilt sich nach der gleicher Muster (s. Tab 3).



**Abbildung 24: Abschnitte von makroskopischen und mikroskopischen Präparaten von Zökum (A); ileozökalem Übergang (B); proximalen Kolon mit oligoganglionärem Bereich (C); distalen Kolon (D).**

**Tabelle 2: Verteilung NADPH positiver Neuronen im Zökum, oralen, mittleren, aboralen proximalen Kolon und distalen Kolon gerechnet durch der Zahl: der Ganglien pro mm<sup>2</sup>, Neuronen pro Ganglien, Neuronen pro mm<sup>2</sup> Oberfläche, Neuronen pro ein Segment mit 1mm Länge.**

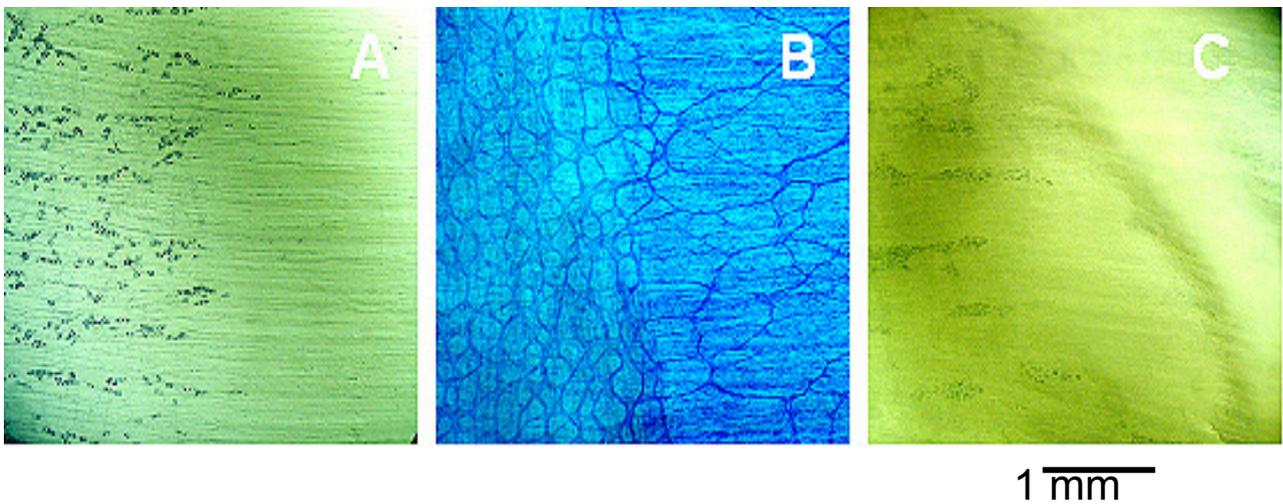
	Zökum				proximales Kolon		distales Kolon
	oralen	mittleren	aboralen Randbereich	aboralen, oligoganglionär			
Umfang des Segments (mm)	21.1	19.6	16.6	3			15.7
Zahl Ganglien pro 1 mm <sup>2</sup>	9.3±2.4	12.1±1.9*	16.2±3.5*	4.7±1.5 ***			9.7±1.4
Neurone pro Ganglion	21.6±3.8	18.1±1.4	18.1±1.6	6.2±3.9***			12.5±1.4
Neurone pro mm <sup>2</sup>	167.4±35.7	218.6±16.5*	292.4±26.4*	29.4±18.7***			120.6 ±13.6
Neurone pro Segment mit 1mm Länge	3532.7±936.2	4293.5±324.2	4185.2±472.0 n.s.				1894.5±214.3

**Tabelle 3: Verteilung der mit Cuprolinic blue gefärbten Neuronen im Zökum, oralen, mittleren, aboralen proximalen Kolon und distalen Kolon gerechnet durch der Zahl: der Ganglien, Neuronen pro Ganglien, Neuronen pro mm<sup>2</sup> Oberfläche, Neuronen pro ein Segment mit 1mm Länge.**

	Zökum				proximales Kolon		distales Kolon
	oralen	mittleren	aboralen Randbereich	aboralen, oligoganglionär			
Umfang des Segments (mm)	21.1	19.6	16.6	3		15.7	
Zahl Ganglien pro 1 mm <sup>2</sup>	9.3±2.4	12.1±1.9*	16.2±3.5*	4.7±1.5***		9.7±1.4	
Neurone pro Ganglion	43.7±1.5	37.6±3.6	44.1±6.1	11.5±2.6***		28.8±3.8	
Neurone pro mm <sup>2</sup>	405.1±13.5	453.3±44.1*	715.2±98.9*	54.5±12.1***		271.1±36.2	
Neurone pro Segment mit 1mm Länge	1478.6±671.5	8920.8±8666.0	10133.2±1427.9 n.s.			4254.7±569.8	

#### 4.5.1 Histologische und Histochemische Charakterisierung des Plexus myentericus in „Whole-mount“ Präparaten.

Auch „Whole-mount“-Präparate, die mit NADPH-Diaphorase, Methylenblau oder Cuproinic blue gefärbt wurden, zeigten im proximalen Kolon die charakteristische oligoganglionäre Region, wobei der Defekt bei Anwendung dieser Präparationstechnik besonders deutlich zur Darstellung kam (s. Abb. 25).



**Abbildung 25: Whole-mounts mit NADPH-Diaphorase-Färbung(A), Methylenblau Vitalfärbung (B) und Färbung mit Cuproinic blue (C) zeigten im proximalen Kolon die gleiche oligoganglionäre Region.**

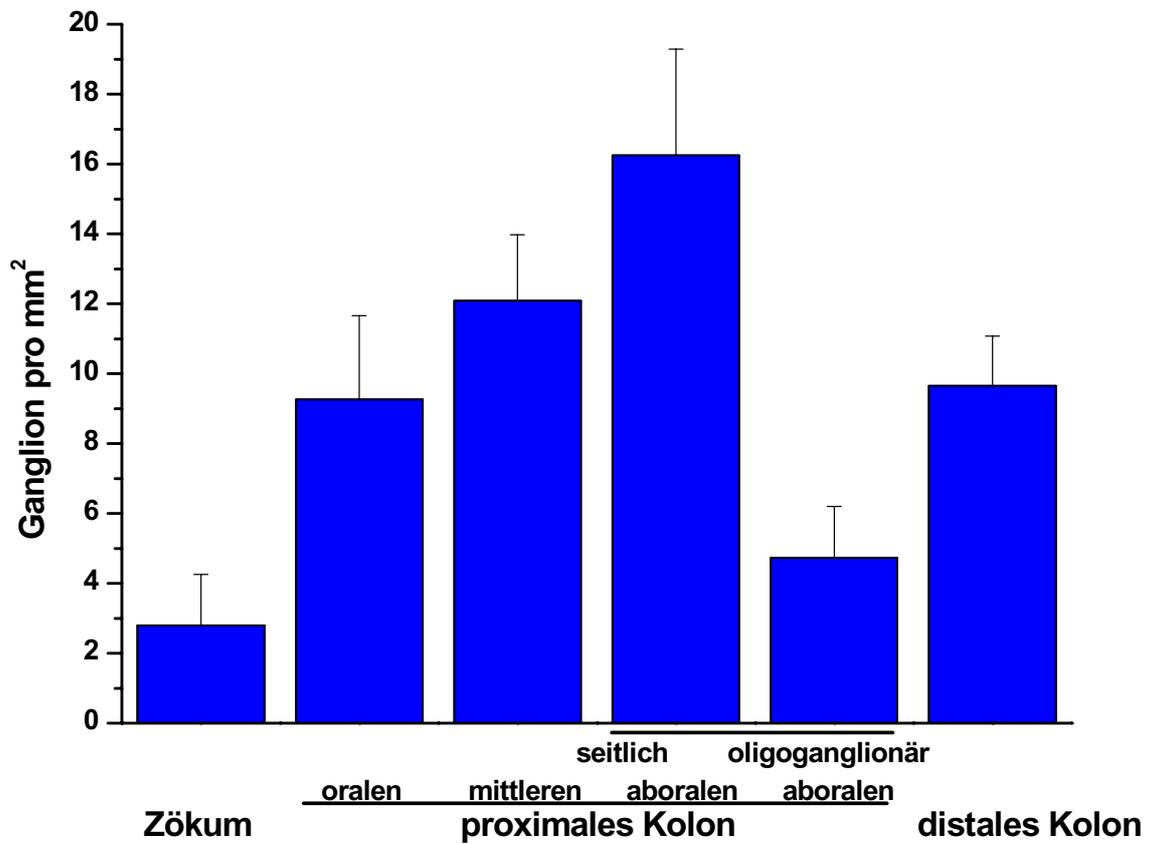


Abbildung 26: Verteilung von myenterischen Ganglia entlang des Dickdarms der Maus gerechnet pro mm<sup>2</sup> Oberfläche.

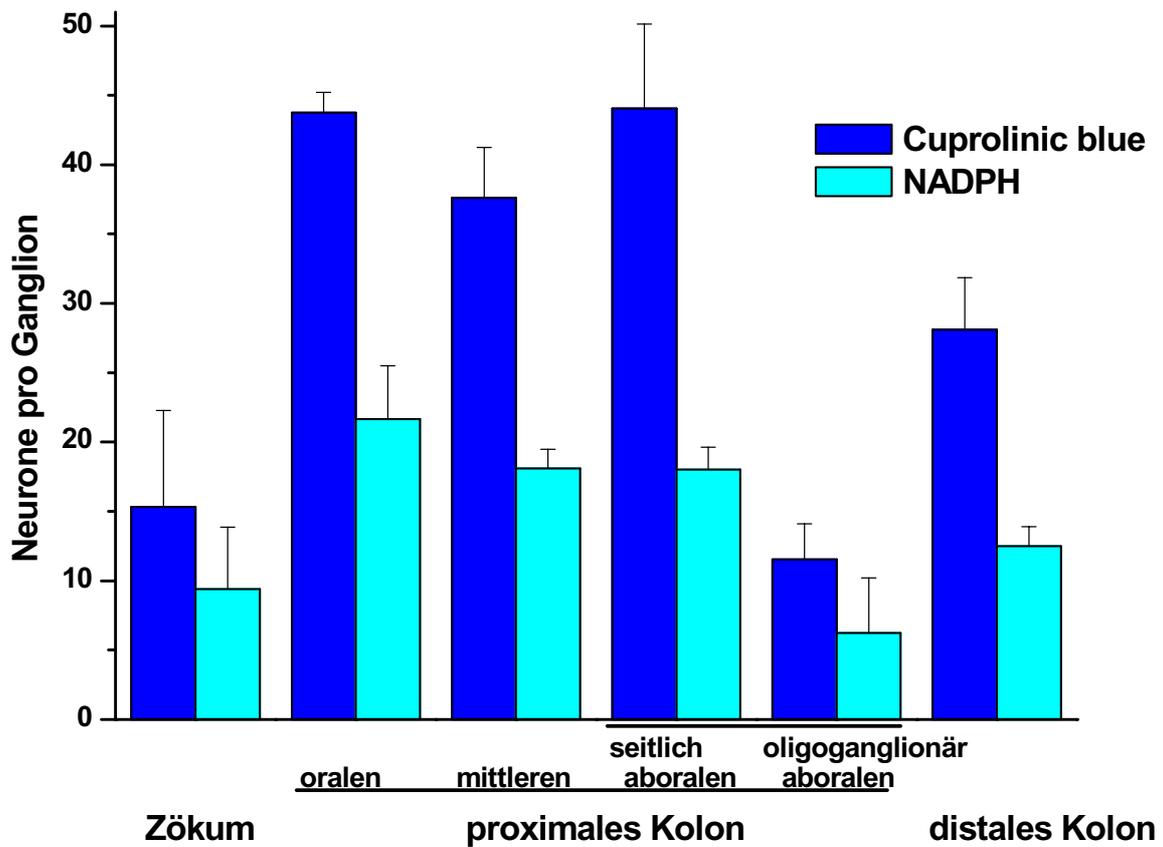


Abbildung 27: Die Zahl von myenterischen Neuronen gefärbt mit Cuproline Blue (dunkelblaue Säulen) und NADPH-positive Neuronen (hellblaue Säule) gerechnet pro ein myenterischen Ganglion.

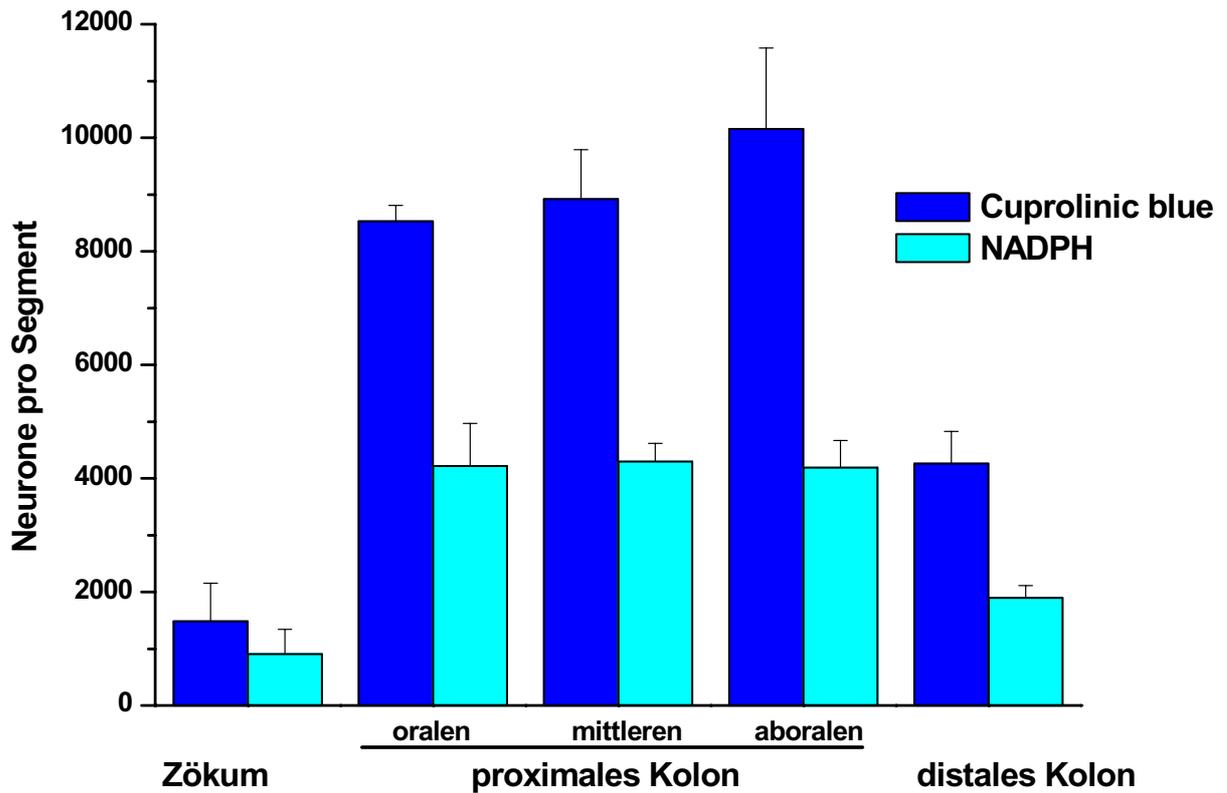
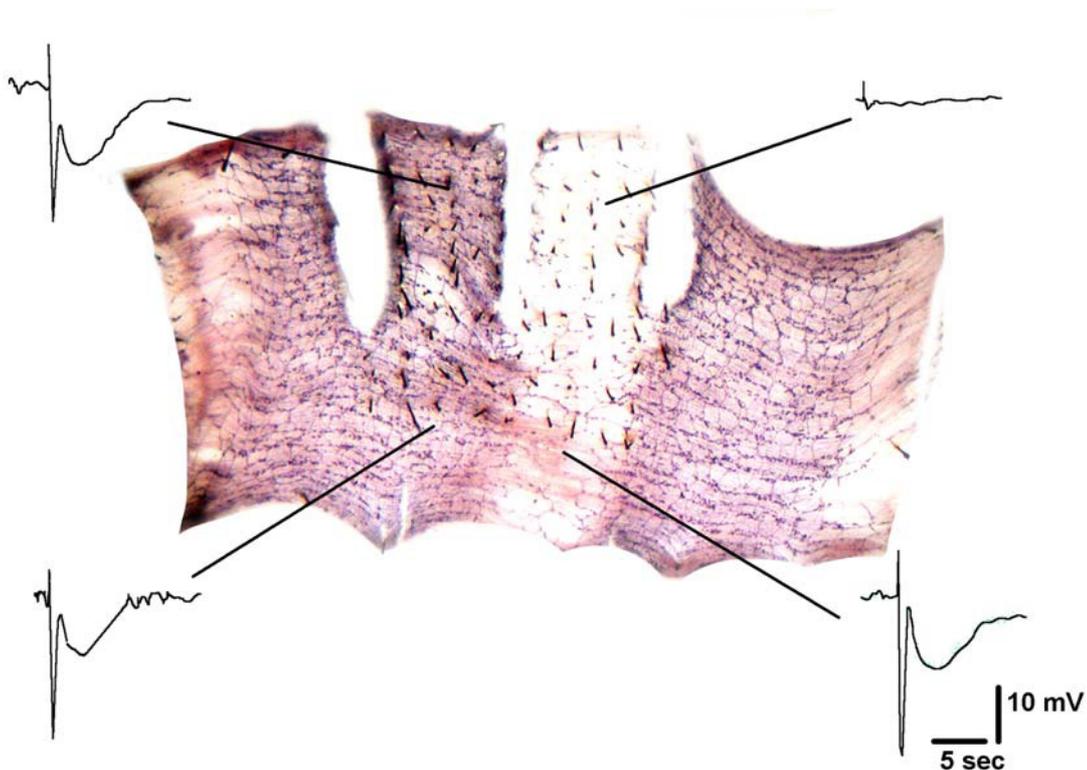


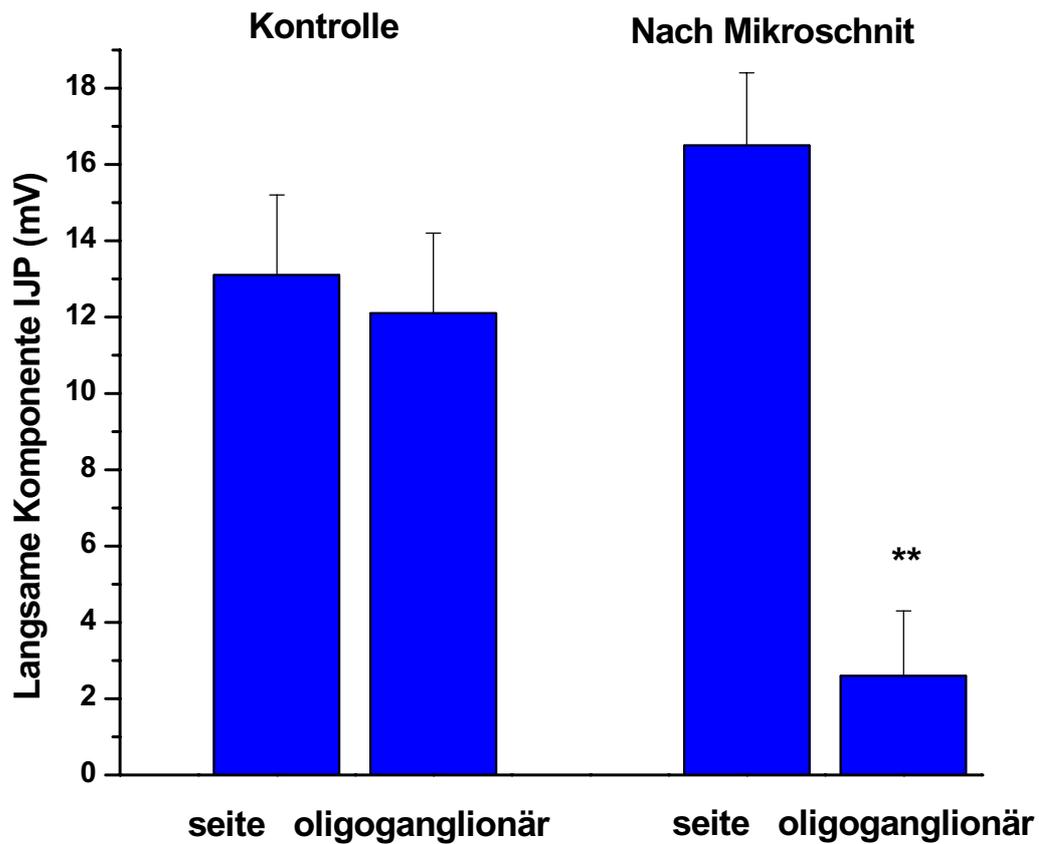
Abbildung 28: Gesamte Zahl von myenterischen Neuronen gefärbt mit Cuproinic Blue (dunkelblaue Säulen) und NADPH-positive Neuronen (hellblaue Säule) gerechnet pro Segment. Die Neuronenzahl im aboralen Segment entspricht dem „Mittelwert“ aus dem oligoganglionären Bereich und dem aus neuronerenreichen Randbereich.

#### 4.6 Elektrophysiologie der oligoganglionären Region.

IJPs aus Muskelzellen der oligoganglionären Region waren mit IJPs vergleichbar, die aus Muskelzellen der benachbarten ganglienreichen Region des gleichen Segments abgeleitet wurden, wenn die Kontinuität der Darmwand erhalten war ( $12.1 \pm 2.1 \text{ mV}$  vs.  $13.1 \pm 2.1 \text{ mV}$   $n=6$ , n.s.). Erst die Trennung der ganglienarmen von der -reichen Region des gleichen Segments bewirkte eine nahezu vollständige Aufhebung der IJPs im ganglienarmen Bereich ( $2.6 \pm 1.7$  ganglienarm vs.  $16.5 \pm 1.9 \text{ mV}$  ganglienreich,  $n=6$ ), während die IJPs der ganglienreichen Region völlig unverändert blieben (s. Abb 29 und Abb. 30).



**Abbildung 29: Originalfoto eines Präparates mit Mikroschnitten von Seiten der oligoganglionären Region. NO positive Neurone des myenterischen Plexus sind mittels NADPH Diaphorase Färbung nach Abschluss der elektrophysiologischen Versuche dargestellt. IJPs aus Muskelzellen der oligoganglionären Region waren IJPs vergleichbar, die aus Muskelzellen der benachbarten ganglienreichen Region des gleichen Segments abgeleitet wurden ( $12.1 \pm 2.1 \text{ mV}$  vs.  $13.1 \pm 2.1 \text{ mV}$ ,  $n=6$ , n.s.). Erst Trennung der ganglienarmen von der -reichen Region des gleichen Segments löschte die IJPs im ganglienarmen Bereich nahezu vollständig aus ( $2.6 \pm 1.7$  ganglienarm vs.  $16.5 \pm 1.9 \text{ mV}$  ganglienreich,  $n=6$ ).**



**Abbildung 30: IJPs aus Muskelzellen der oligoganglionären Region waren mit IJPs vergleichbar, die aus ganglienreichen Region abgeleitet wurden. Nach der Trennung der ganglienarmen von der -reichen Region bewirkte eine nahezu vollständige Aufhebung der IJPs im ganglienarmen Bereich (n=6).**

## 5 Allgemeine Diskussion

### 5.1 Anatomie des Dickdarms.

Das Kolon der Maus, an dem die vorliegenden Versuche durchgeführt wurden, lässt sich makroskopisch in 3 Abschnitte gliedern. Das proximale Kolon ist durch eine charakteristische, schräge Schleimhautfältelung gekennzeichnet, die eine palmbblätterartige Musterung ergibt. Es geht in die grosse Kolonflexur über, die cranial an Leber und Magen stösst. Die grosse Flexur und das sich anschliessende distale Kolon besitzen eine längs gefältelte Mucosa. Lymphoide Plaques liegen gleichmässig im Kolon verteilt. Die Darmwand ist aus mehreren konzentrischen Schichten aufgebaut. Aussen wird das Kolon von der Tunica serosa umschlossen. Die äusserste Begrenzung aus Peritonealzellen deckt die Tela subserosa aus Binde- und Fettgewebe ab. Nach innen schliesst sich die Tunica muscularis mit einer externen, longitudinalen und einer internen, circulären Lage glatter Muskulatur an. Zwischen diesen beiden Schichten liegen die Ganglionzellen des myenterischen Plexus (Auerbach-Plexus). Darauf folgt die Tela Submucosa. In ihrem lockeren Bindegewebe sind Blut- und Lymphgefässe, lymphatisches Gewebe und neuronale Strukturen, der Plexus submucosus (Meissner-Plexus), eingebettet. Die äussere Begrenzung der Tunica mucosa, der eigentlichen Darmschleimhaut, wird von der Lamina muscularis mucosae gebildet. Subepithelial schliesst sich die Lamina propria an, die hauptsächlich aus Bindegewebszellen besteht, in die Blutgefässe, Lymphfollikel (Folliculi lymphatici solitarii) und zahlreiche Immunzellen eingelagert sind. Die Oberflächenschicht der Mucosa, Lamina epithelialis, ist zusammengesetzt aus Becherzellen zur Schleimproduktion und aus hochprismatischen Zylinderepithelzellen, den Enterozyten. Die Mucosa des Kolons ist zottenlos und bildet dicht nebeneinanderstehende Krypten (Glandulae intestinales).

Morphologische Besonderheiten des proximalen Kolon sind die noch schmalere, höhere Epithelzellen und die ungewöhnlich grossen Becherzellen. Die Epithelzellen besitzen eine polare Struktur. Die der Blutseite zugewandte Plasmamembran wird als basolaterale Membran bezeichnet. Die seitlichen Bereiche der basolateralen Membranen, die lateralen Zellmembranen, begrenzen die Interzellulärspalten. Die funktionelle Aussenseite des Epithels wird von der apicalen Membran abgeschlossen, die am Kolon mit Microvilli zur Oberflächenvergrösserung ausgestattet ist, also eine Bürsten-Saummembran bildet.

## 5.2 Glatte Muskulatur

Dieser Muskeltyp wird deshalb glatt genannt, weil er lichtmikroskopisch keine Querstreifung wie die Skelettmuskulatur oder Herzmuskulatur aufweist (Fausson-Pellegrini *et al.*, 1990).

Glatte Muskeln sind spindelförmig, besitzen einen zentralständigen Zellkern und sind zwischen 50 und 400 µm lang und 2 - 10 µm dick. Sie sind miteinander durch spezielle Zellkontakte, sog. Desmosomen verbunden und ausserdem in eine Bindegewebsmatrix eingebettet, die eine für die Kontraktion günstige Längeneinstellung des Muskels bewirkt. So ist die Anpassung an sehr unterschiedliche Dehnungszustände wie z.B. bei der Harnblase möglich (Gabella, 1990).

Prinzipiell kann man die glatte Muskulatur in zwei Haupttypen, den "single unit" -Typ und den "multi unit" -Typ untergliedern, wobei es jedoch viele Mischformen gibt. Der "single unit" -Typ, zu dem auch die Darmmuskulatur gehört ist gekennzeichnet durch spezielle, niederohmige Zellkontakte: Nexus oder Gap-junctions, über die elektrische Impulse von Zelle zu Zelle weiter geleitet werden, so dass aus den einzelnen Zellen funktionelle Einheiten entstehen (Gabella, 1989; Thuneberg & Peters, 2001). Ferner zeichnet sich dieser Typ durch eine spontane rhythmische Aktivität aus (ICC), die durch vegetative Nervenimpulse moduliert wird.

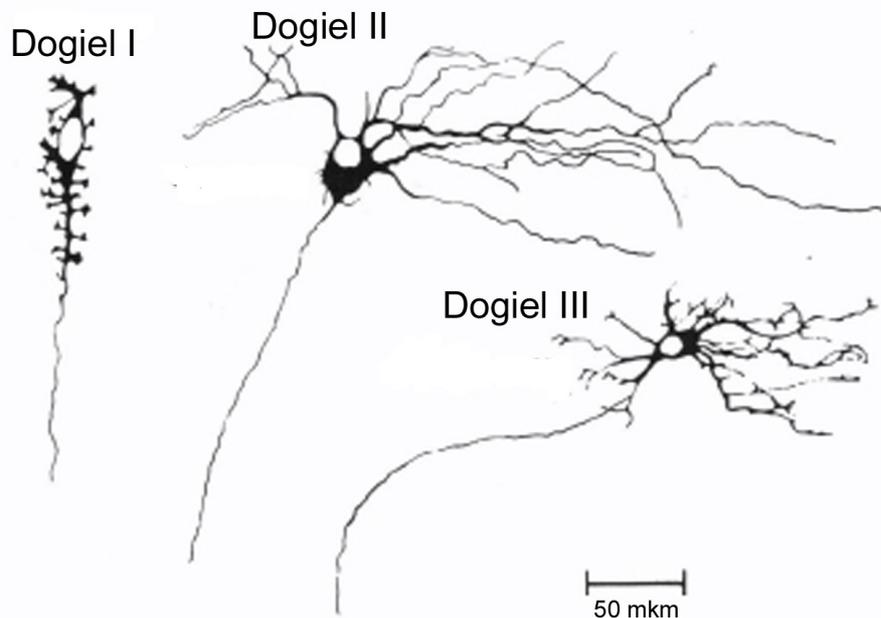
Dem gegenüber steht der sog. "multi unit" -Typ, der sich z. B. im Ziliarmuskel, dem Samenleiter oder Irismuskel findet. Hier besitzen die Muskeln zwar ebenfalls die bereits erwähnten Gap junctions jedoch besitzen die Muskeln keine Eigenaktivität, sondern werden überwiegend durch vegetative Neurone erregt bzw. inhibiert.

## 5.3 Neuronentypen und Einteilung nach Dogiel

Funktionell kann man die Neurone des enterischen Nervensystem untergliedern in Motorneurone, sensorische Neurone und Interneurone. Alle Populationen sind im Plexus myentericus und submucosus vorhanden.

Die enterischen Neurone werden nach der Klassifikation von Dogiel eingeteilt (Dogiel, 1899). So unterschied er morphologisch drei unterschiedliche Typen (s. Abb. 31).

## Morphologie nach Dogiel



**Abbildung 31: Neurone des enteralen Nervensystems. Einteilung nach Dogiel in Typ I bis III. Alle Populationen sind im Plexus myentericus und submucosus vorhanden (nach Dogiel, 1899).**

Dogiel Typ I Neurone sind uniaxonale Neurone mit einer Vielzahl kleiner Dendriten, die vom Zellkörper ausgehen. Zu ihnen rechnet man vor allem diejenigen Neurone, die zur Muskulatur ziehen. Man bezeichnet sie auch als S-Neurone, da sie ein schnelles exzitatorisches Potential aufweisen. Sie können je nach freigesetzten Transmitter sowohl eine exzitatorische wie auch eine inhibitorische Wirkung entfalten und repräsentieren Motoneurone.

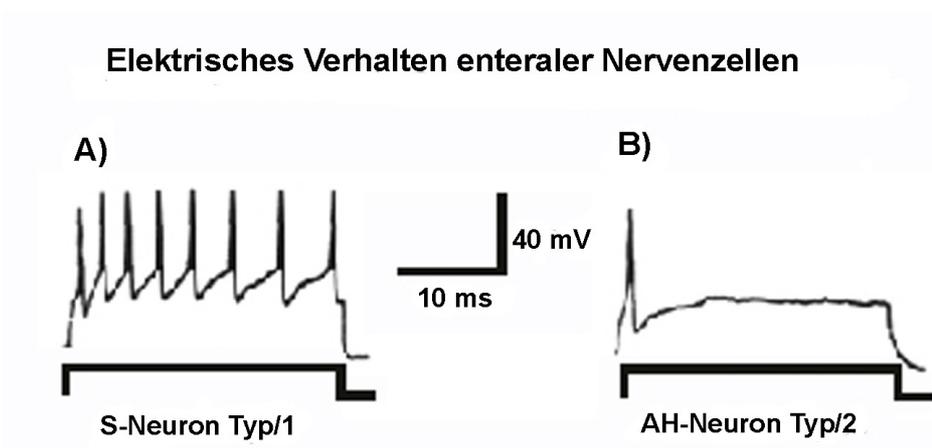
Dogiel Typ II Neurone besitzen eine glattere Oberfläche mit langen und kurzen Dendriten und einem Axon. In dieser Gruppe findet man sensorische Neurone, die aufgrund einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation elektrophysiologisch auch als AH-Neurone beschrieben werden.

Im Vergleich zu Dogiel Typ II Neuronen besitzt der Dogiel Typ III mehrere kurze Dendriten am Zellkörper. Eine weiterführende Differenzierung der Neurone nach morphologischen Gesichtspunkten ist durch Stach beschrieben worden (Stach, 1981), deren funktionelle Konsequenz jedoch unklar ist.

## 5.4 Elektrisches Verhalten des Plexus myentericus

Nach ihren elektrophysiologischen Eigenschaften lassen sich die Neurone in den meisten Abschnitten des enteralen Nervensystems mit Ausnahme des Magens in zwei Gruppen einteilen:

1. AH- (oder Typ-2) Neurone, die eine gegenüber dem Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX)-resistentes Aktionspotential und eine langdauernde Nachhyperpolarisation aufweisen. Das Aktionspotential wird bei diesen Zellen durch einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen getragen.
2. S- (oder Typ-1) Neurone, die TTX-sensitive Aktionspotentiale über einen Einstrom von  $\text{Na}^+$  -Ionen generieren (siehe Abb. 32).



**Abbildung 32: Elektrisches Verhalten enteraler Nervenzellen. Differenzierung der Neurone in ein (A) S / Typ 1 Neuron, das nach Depolarisation repetitiv Aktionspotentiale feuern kann, und (B) AH/Typ 2 Neuron, das nach einem Aktionspotential eine lange Nachhyperpolarisation zeigt (nach Wood, 1994).**

## 5.5 “Interstitial cells of Cajal”

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Cajal im GI Trakt fusiforme und sternförmige Zellen, die einen prominenten Nukleus und variköse Ausläufer aufwiesen, zwischen Nervenendigungen und Effektorzellen lagen und eine Art Netzwerk bildeten. Cajal postulierte, dass diese Zellen eine besondere Art von Neuronen seien, die eine Rolle bei der Neurotransmission spielen (Cajal SR, 1893). Sie wurden später nach ihrem Erstbeschreiber als interstitielle Zellen nach Cajal ( ICC ) bezeichnet. Es wurde später aber von Taxi gezeigt, dass diese Zellen weder Neurone noch Schwann- Zellen waren, und durch die enge Lagebeziehung zu varikösen Nervenendigungen eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission spielen (Taxi, 1969).

So konnte gezeigt werden, dass die ICC eine spontane Rhythmizität aufweisen und für die Generierung von bestimmten Potentialschwankungen, sogenannten "slow waves" verantwortlich sind, die äusserst wichtig für die gastrointestinale Motilität sind (Barajas-Lopez *et al.*, 1989; Daniel *et al.*, 1998). Diese „slow waves“ werden durch Tetrodotoxin, einem Blocker neuronaler Übertragung nicht beeinflusst (Daniel *et al.*, 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass die ICC reich an Mitochondrien sind, was für eine stoffwechselaktive Rolle bei der Motilitätsregulation spricht (Komuro, 1999).

Als Bindeglied zwischen ICC und Muskulatur wurden Gap junctions zwischen den beiden Zelltypen entdeckt, die als Übertragungsweg elektrischer Impulse postuliert wurden.

Entscheidend für die enormen Fortschritte in der ICC-Forschung in den letzten zehn Jahren war die Entdeckung, dass interstitielle Zellen das Proto-Onkogen „c-Kit“ exprimieren, das für den Tyrosinkinase-Rezeptor „Kit“ kodiert (Burns *et al.*, 1997). Damit war ein zuverlässiger immunhistochemischer Marker zur weitgehend selektiven Anfärbung von interstitiellen Zellen gefunden und zugleich ein Angriffspunkt für die Manipulation der ICC-Funktion gefunden, da die Entwicklung und vor allem die Differenzierung interstitieller Zellen von der Expression von „Kit“ als Wachstumsfaktor-Rezeptor abhängt.

Den ICC gemeinsam ist die Expression des sog. cKIT Rezeptors, der ein Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität und ein Protoonkogen ist. Der für cKIT codierende Genabschnitt, der sog. W Locus liegt bei der Maus auf Chromosom 5. Es gelang Mäuse zu züchten, die eine Mutation an dem entsprechenden Locus aufwiesen, so dass die Tiere überlebten aber kein cKIT mehr exprimierten. Die hinsichtlich des W Locus heterozygoten Tiere ( $W/W^V$ ) fallen durch ein Fehlen bestimmter ICC- Klassen auf. Daraus ergibt sich das

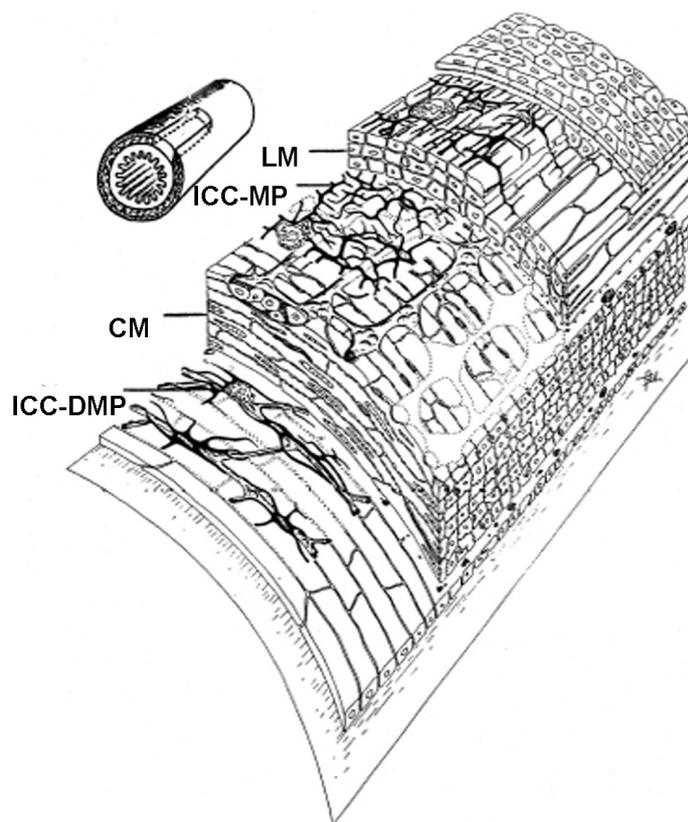
Verschwinden normalerweise vorhandener Slow wave Potentiale, verbunden mit einem abnormen intestinalen Motilitätsmuster (Chang *et al.*, 2001).

Dies ist konsistent mit den Untersuchungen, dass das Verschwinden von slow waves mit Appräparation der ICC enthaltenden Darmschichten v.a. zwischen Längs- und Ringmuskulatur sowie durch eine (relativ unspezifische) pharmakologische Blockierung der ICC durch Methylenblau erzielt werden kann (Suzuki *et al.*, 1986).

Die ICC scheinen also mittels der Generierung von slow wave Potentialen essentiell für die Entstehung gastrointestinaler Motilität zu sein. Mittels Immunreaktivität gegen den cKit Rezeptor konnte die Verteilung der ICC im GI Trakt genauer spezifiziert werden.

### 5.5.1 Morphologie von ICC

Topographisch liegen ICCs innerhalb der Tunica muscularis des Verdauungskanals, wo sie sich vom Ösophagus bis hin zum Anus ausbreiten. Aufgrund von räumlicher Anordnung und physiologischen Charakteristika lassen sich mehrere Gruppen von ICCs unterscheiden (Sanders, 1996) (Abb.33).



**Abbildung 33 Räumlicher Anordnung der ICC.**

Im Bereich des myenterischen Plexus gelegene ICCs (IC-MY) umgeben netzartig die myenterischen Ganglien und sind über gap junctions untereinander und an die umgebende Schicht glatter Muskelzellen gekoppelt. IC-MY generieren rhythmische, lang anhaltende elektrische Wellen, die passiv in die umgebende glatte Muskulatur fortgeleitet werden. Diese „pacemaker“-Funktion führt im Zusammenspiel mit der umgebenden glatten Muskulatur zur Entstehung von charakteristischer „slow wave“-Aktivität (Hanani & Freund, 2000; Barajas-Lopez *et al.*, 1989).

Dem gegenüber stehen intramuskulär lokalisierte interstitielle Zellen (IC-IM), die die Mukelzellschichten durchziehen und dabei ein dichtes intramuskuläres Netz bilden. Ihnen wird eine zentrale Rolle als strukturelles und funktionelles Bindeglied zwischen ENS und glatter Muskulatur zugeschrieben. Zwischen Nervenfasern und Muskelzellen bestehen in den Muskelschichten des Verdauungskanal auffällig lose räumliche Verbindungen mit neuromuskulären Abständen von bis zu mehreren 100 nm, was eine direkte Neurotransmission nur schwer möglich erscheinen lässt. Dagegen bestehen sehr enge Kontakte zwischen exzitatorischen wie inhibitorischen Nervenfasern und ICCs einerseits und enge Zellkontakte sowie gap junctions zwischen ICCs und Muskelzellen andererseits (Daniel & Wang, 1999).

Ferner konnte gezeigt werden, dass ICCs zahlreiche Rezeptoren für Neurotransmitter einschliesslich muskarinergen Rezeptoren (Ward *et al.*, 2000), Somatostatin (Vannucchi, 1999), VIP- und NK<sub>1</sub>-Rezeptoren (Ekblad *et al.*, 1998) exprimieren und zudem auf extrinsische oder intrinsische nitrege Stimulation mit gesteigerter cGMP-Bildung reagieren und somit eine Zielstruktur für neuronales NO darstellen. In Mäusen mit verringerter Tyrosinkinaseaktivität (natürliche Mutante mit Blockierung des „Kit“-abhängigen Pathways), wo IC-IM u.a. im Bereich des Magens fehlen, wurde eine deutliche Verringerung inhibitorischer postsynaptischer Potentiale nach elektrischer Stimulation und eine deutliche Abschwächung der durch exogenes NO hervorgerufenen Hyperpolarisation glatter Muskulatur gemessen (Dickens *et al.*, 2001), was auf eine zentrale Rolle interstitieller Zellen in der inhibitorischen Neurotransmission hinweist.

Auch exzitatorische, ChAT- oder SP-positive Nervenfasern stehen in engem, synapsenähnlichem Kontakt zu intramuskulären interstitiellen Zellen (Tonini *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1999). Trotz unveränderter Nervenfaserdichte waren in den Tyrosinkinase-mutanten durch cholinerge Stimulation kaum mehr exzitatorische postsynaptische Potentiale nachweisbar (Ward & Sanders, 2001), so dass auch in der exzitatorischen neuromuskulären Signalübertragung IC-IM eine entscheidende Rolle einzunehmen scheinen.

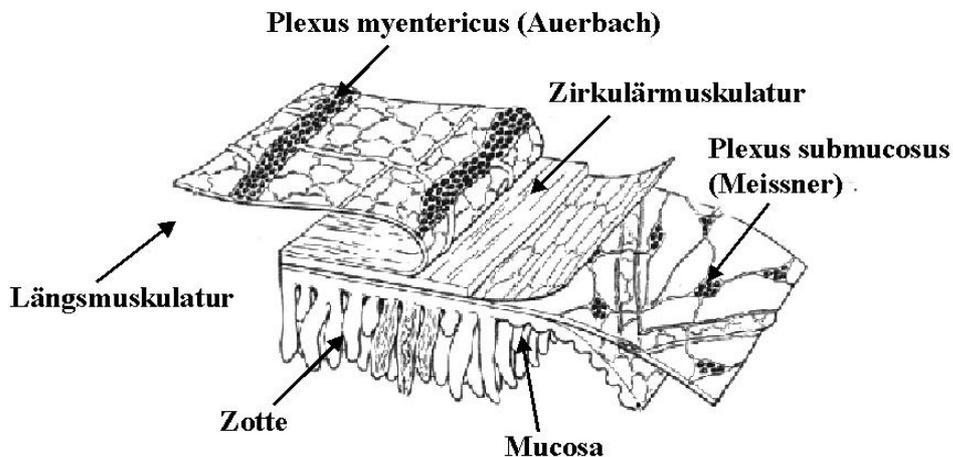
Eine dritte Gruppe interstitieller Zellen findet sich innerhalb des „deep muscular plexus“ des Dünndarms und wird daher als IC-DMP bezeichnet. Funktionell entsprechen diese ICCs weitgehend dem intramuskulären Typ (IC-IM).

In Zusammenschau deuten die derzeit vorliegenden Ergebnisse auf eine zentrale Rolle interstitieller Zellen in der Generierung und Modulation gastrointestinaler

Motilitätsvorgänge hin. Über eine evt. pathophysiologische Bedeutung interstitieller Zellen bei der Entstehung verschiedenster Motilitätsstörungen kann bislang nur spekuliert werden.

## 5.6 Neuromuskuläre Interaktion im Gastrointestinaltrakt.

Alle Funktionen des Gastrointestinaltrakts unterliegen komplexen Kontrollmechanismen, die über ein eigenständiges, in der Wand des Gastrointestinaltrakts lokalisiertes Nervensystem, das enterische Nervensystem (ENS), reguliert werden (Wood, 1979). Die Existenz dieses Nervensystems ist seit weit über hundert Jahren bekannt. Die ersten Untersuchungen beschränkten sich damals auf die anatomisch-morphologischen Eigenschaften dieses Nervensystems. Von Meissner und Auerbach wurden 1857 bzw. 1862 (Auerbach L, 1862) zwei in der Darmwand lokalisierte Nervengeflechte beschrieben; der zwischen Zirkulärmuskulatur und Mukosa liegende submuköse Plexus (Meissner, 1857), welcher vor allem die Mukosafunktionen koordiniert, und der zwischen Zirkulär- und Längsmuskulatur gelegene myenterische Plexus (Auerbach, 1862), der für die Muskelfunktionen verantwortlich ist (Abb. 34).



**Abbildung 34** Enterales Nervensystem. Der Plexus myentericus befindet sich zwischen der Längs- und Zirkulärmuskulatur des Magen-Darm-Trakts. Der Plexus submucosus ist zwischen Zirkulärmuskulatur und Mukosa lokalisiert (nach Furness & Costa, 1980).

Beide Plexus bestehen aus Nervenzellen, die in Ganglien variabler Grösse organisiert sind. Ein dichtes Netzwerk von Fasersträngen verbindet die enterischen Nervenzellen untereinander und mit den Effektororganen bzw. mit anderen Teilen des autonomen Nervensystems. Bis zur Jahrhundertwende wurde das ENS als ein diffuses parasympathisches Ganglion angesehen, in dem direkte synaptische Verbindungen zwischen präganglionären extrinsischen Nervenfasern und postganglionären Motorneuronen die Basis für die Kontrolle gastrointestinaler Funktionen darstellten. Der eigentliche Begriff enterisches Nervensystem wurde erst von Langley 1921 eingeführt, um dieses in der Darmwand lokalisierte neuronale Netzwerk vom sympathischen und parasympathischen Nervensystem abzugrenzen (Langley, 1921). Langley verwendete diesen Begriff, da er überzeugt war, dass enterische Ganglien einzigartige und besondere funktionelle Charakteristika aufweisen, die sie von anderen autonomen Ganglien ausserhalb des Gastrointestinaltrakts unterscheiden. Heute ist die Unterteilung des autonomen Nervensystems in drei unabhängige Teilsysteme, das sympathische, das parasympathische und enterische Nervensystem etabliert. Langley's konzeptioneller Ansatz basierte auf zwei Beobachtungen. Zum einen war ihm schon damals bekannt, dass die Anzahl enterischer Nervenzellen die Zahl der den Darm versorgenden extrinsischen sympathischen und parasympathischen Nervenfasern bei weitem übersteigt. Einigen tausend extrinsischen Nervenfasern stehen mehrere 100 Millionen enterischen Nervenzellen gegenüber. Das enterische Nervensystem ist damit die grösste Ansammlung von Nerven ausserhalb des Gehirns und besitzt sogar mehr Nervenzellen als das Rückenmark.

Zum anderen begründete Langley die Eigenständigkeit des ENS mit der Beobachtung, dass selbst in einem isolierten Dünndarmsegment in vitro die gerichtete Propulsion eines intraluminalen Bolus zu beobachten war (Langley & Anderson H.K, 1895). Diese intestinale Propulsion wird verursacht durch eine Muskelkontraktion oral und eine Muskelrelaxation anal des Stimulus. Dieser Reflex wurde aufgrund seiner grundlegenden Bedeutung für den Magen-Darmtrakt 1899 schon von Bayliss und Starling als "law of the intestine" bezeichnet (Bayliss & Starling, 1900). Der peristaltische Reflex kann sowohl durch mechanische Stimulierung der Muskulatur oder der Mukosa als auch durch chemische Stimuli im Darmlumen ausgelöst werden (Bayliss & Starling, 1900). Die funktionelle Bedeutung des peristaltischen Reflexes liegt in der Gewährleistung eines anal gerichteten Transports des Chymus. Die heutigen Konzepte betrachten das ENS als ein unabhängiges, integratives System, welches strukturell und funktionell Ähnlichkeiten zum

zentralen Nervensystem (ZNS) aufweist (Wood, 1994). So enthält das ENS eigene sensorische Neurone, Interneurone und Motoneurone. Sensorische Neurone kodieren als Chemo- oder Mechanorezeptoren verschiedene Stimuli, die auf die Magendarmwand einwirken, und leiten die Information innerhalb des ENS weiter. Interneurone leiten diese Information weiter und regulieren die Erregbarkeit der Motoneurone, die dann letztendlich die Aktivität der Muskulatur und der Mukosa modulieren (Wood, 1994).

Aufgrund seiner Komplexität und der funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit zum Gehirn wird das ENS auch als "little brain of the gut", oder als "Darmgehirn", bezeichnet. Das ENS ist durch verschiedene intrinsische Reflexe fähig, die zahlreichen Funktionen des Magen-Darmtrakts, wie motorische und sekretorische Vorgänge, Durchblutung und Modulation von Immunvorgängen zu steuern (Costa *et al.*, 1992a; Costa & Furness, 1976; Furness *et al.*, 1996; Wood, 1994). Die Funktion extrinsischer sympathischer oder parasympathischer Nervenfasern besteht primär darin, enterische Schaltkreise zu modulieren. Dieses Konzept der permissiven Rolle des extrinsischen Nervensystems ermöglicht dem Sympathikus und Parasympathikus, die motorische und sekretorische Aktivität des Magen-Darmtrakts in beschränktem Umfang zu beeinflussen (Schemann & Grundy, 1992; Hillsley *et al.*, 1992). Erst in den 80er Jahren erfolgte durch den Einsatz elektrophysiologischer Techniken die neurophysiologische Charakterisierung des ENS (Nishi & North, 1973; Hirst & McKirdy, 1974).

Intrazelluläre Ableitungen von enterischer Nervenzellen ermöglichten die Charakterisierung ihrer elektrischen und synaptischen Eigenschaften und bestätigten die Komplexität der Verschaltungen innerhalb des ENS. Elektrophysiologisch unterschieden sich mehrere Zellpopulationen. Als besonders bemerkenswerter Befund zeigte sich, dass das ENS, ähnlich wie das ZNS, über das gesamte Repertoire an hemmenden und aktivierenden synaptischen Mechanismen verfügt, um interneuronale und neuromuskuläre Interaktionen aufrechtzuerhalten. Im Laufe der letzten Jahre erfolgte durch die Anwendung und Kombination elektrophysiologischer, neurochemischer und neuropharmakologischer Techniken die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung unterschiedlicher Nervenpopulationen im ENS. Bis heute sind über 20 Neurotransmitter und weitere Neuromodulatoren identifiziert, die an der Vermittlung der synaptischen Vorgänge im ENS beteiligt sind (McConalogue & Furness, 1994). Damit besitzt das ENS eine breite Palette von Neurotransmittern, die einzelne Effektorsysteme, wie die glatte Muskulatur, hemmen oder aktivieren können.

Trotz der enormen Anzahl an Neurotransmittern, die theoretisch mehrere hundert Kolokalisationsmuster zulassen, existieren im ENS nur ca. 20 Populationen, die sich durch eine spezifische Kodierung (chemical coding) auszeichnen. Dabei existiert jedoch eine Regionen spezifische Variabilität des Innervationsmusters und des neurochemischen Codes, was darauf hinweist, dass sich das ENS auf spezifische Funktionen der verschiedenen Regionen des Magen-Darmtrakts adaptiert hat. Des Weiteren existieren zum Teil erhebliche Spezies-spezifische Unterschiede, obwohl die Funktionen der entsprechenden Regionen des Magen-Darmtrakts vergleichbar sind (Cornelissen *et al.*, 1999). Die Kenntnisse über die Neurotransmitterkodierung der Nervenzellen basieren primär auf Untersuchungen am Meerschweinchendarm (Costa *et al.*, 1992a).

Die wichtigsten exzitatorischen Transmitter, die zu einer Aktivierung der glatten Muskulatur führen, sind Azetylcholin und das Neuropeptid Substanz P. Die inhibitorischen Transmitter, die zu einer Hemmung der glatten Muskulatur führen, sind Stickstoffmonoxid (NO), Adenosin 5'-Triphosphat (ATP), Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Adenylatzyklase Aktivierendes Polypeptid (PACAP "Pituitary Adenylat Cyclase Activating Polypeptide").

Die Voraussetzung einer funktionierenden Motilität im Magen-Darmtrakt ist ein optimal abgestimmtes Zusammenspiel von sowohl hemmend als auch erregend wirkenden nervaler Regulationsmechanismen. Als Hauptkomponente des erregenden Mechanismus ist Azetylcholin bekannt. Das Azetylcholin wird hierbei nicht von parasympathischen Nervenfasern, sondern fast ausschliesslich von Nervenzellen des ENS ausgeschüttet. Der hemmende Mechanismus wird durch Freisetzung von mehr als einem Neurotransmitter vermittelt (Costa *et al.*, 1986b; Crist & He, 1991; Maggi & Giuliani, 1993).

Die Zirkulärmuskulatur wird bei allen bisher untersuchten Spezies sowohl von erregenden als auch von hemmenden Motorneuronen innerviert. Die Innervation der Längsmuskulatur erfolgt, zumindest im Dünndarm kleiner Labortiere, primär durch erregende cholinerge Motorneurone des ENS (Brookes *et al.*, 1992; Cheung & Daniel, 1980). Die Längsmuskulatur enthält bei diesen Spezies keine direkte, hemmende Innervation sondern relaxiert passiv als Folge einer Kontraktion der Zirkulärmuskulatur. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass die Längsmuskulatur im Kolon dieser Tiere durch hemmende Motorneurone des ENS reguliert wird und damit auch aktiv relaxieren kann (Stevens *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 1999a; Smith & Robertson, 1998).

Die funktionelle Bedeutung und die Wirkungsweise der Neurotransmitter kann an isolierten Magen- bzw. Darmpräparaten untersucht werden. In isolierten Darmpräparaten können enterische Nerven selektiv elektrisch gereizt werden, um die Ausschüttung ihrer Transmitter zu stimulieren. Die elektrische Feldstimulation führt in den meisten Fällen zu einer Mischantwort, die aus hemmenden und erregenden Komponenten besteht. Obwohl die zeitliche und räumliche Differenzierung durch diese Art der Stimulation verloren geht, spiegeln die Antworten die Vorgänge wieder, die auch bei der Initiierung des peristaltischen Reflexes ablaufen. Die Wirkungen der verschiedenen Neurotransmitter auf die Aktivität der glatten Muskulatur kann dann registriert und neuropharmakologisch analysiert werden. Dabei untersucht man die Wirkung der Agonisten bzw. verschiedener Rezeptorspezifischer Antagonisten auf die durch elektrische Stimulation induzierte Muskelantworten bzw. deren Wirkung auf die durch exogene Applikation der Neurotransmitter hervorgerufenen Motilitätsänderungen. Solche Untersuchungen erlauben die Differenzierung verschiedener Komponenten, da die durch elektrische Stimulation induzierte Antwort immer auf der Ausschüttung eines Transmittercocktails basiert.

Die erregenden und hemmenden Wirkmechanismen der Neurotransmitter werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

## 5.7 Wichtige Überträgerstoffe

Das enterale Nervensystem verfügt über eine Vielzahl von verschiedenen Neurotransmittern, die auf benachbarte Neurone, die glatte Muskulatur der Darmwand, auf Gefäße sowie auf die Epithelzellen einwirken (Übersicht bei Schemann, 2001(Schemann *et al.*, 2001) . Eine Klassifizierung der einzelnen Überträgerstoffe kann nach ihrer erregenden und hemmenden Wirkung durchgeführt werden. Zu den bedeutendsten gehören:

Amine:	Acetylcholin, Noradrenalin, Serotonin.
Aminosäuren:	GABA
Purine:	ATP
Gase:	NO, CO
Peptide:	Calcitonin Gene Related Peptide, CCK, Neuropeptid Y, Neurotensin, Opioide, PACAP, Somatostatin, Substanz P, VIP.

### 5.7.1 Azetylcholin.

Im Magen-Darmtrakt führt die Freisetzung von Azetylcholin zu einer Kontraktion. Gershon konnte vor 1970 den Beweis dafür liefern, dass Azetylcholin ein Neurotransmitter im autonomen Nervensystem ist (Gershon, 1967). Als Neurotransmitter im ENS wirkt Azetylcholin auf die glatte Muskulatur über muskarinerge Rezeptoren, die vermutlich zum M3-Rezeptorsubtyp gehören. Mit Hilfe von Antikörpern gegen die Cholin-Azetyltransferase (ChAT), ein Enzym der Azetylcholinsynthese, können Azetylcholin synthetisierende Nervenzellen im ENS dargestellt werden (Costa *et al.*, 1986a; Schemann *et al.*, 1993).

### 5.7.2 NO

Stickstoffmonoxid wurde ursprünglich als relaxierender Faktor des Endothels von Blutgefäßen identifiziert, der eine Vasodilatation vermittelt. Inzwischen ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid im Magen-Darmtrakt als hemmender Neurotransmitter wirkt (Sanders *et al.*, 1992; Stark *et al.*, 1993; Stark *et al.*, 1991a; Rand & Li, 1995, Bult *et al.*, 1990; Desai *et al.*, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die nach Stimulation von hemmenden Nerven ausgeschütteten Transmitter zu einer Membranhyperpolarisation der glatter Muskelzellen am Darm führen. (Stark *et al.*, 1991b; Stark *et al.*, 1993). Dies bewirkt eine Relaxation und/oder eine Hemmung der Kontraktilität. Stickstoffmonoxid wird durch das Enzym Stickoxid-Synthase (NOS) produziert.

Anhand des immunhistochemischen Nachweises dieses Enzyms konnten Populationen nitrerger enterischer Neurone im myenterischen und submukösen Plexus sowie in NOS+ Nervenfasern identifiziert werden (Furness & Anderson, 1994). Des Weiteren konnte eine direkte Beteiligung am peristaltischen Reflex nachgewiesen werden (Waterman & Costa, 1994).

### 5.7.3 ATP

ATP ist, neben seiner Funktion als wichtiger Energieträger im Organismus, ein Neurotransmitter. Burnstock stellte 1972 die sogenannte purinerge Hypothese auf, nach der ATP im autonomen Nervensystem als Neurotransmitter fungiert (Burnstock *et al.*, 1972). Diese Hypothese ist inzwischen durch mehrere Studien erhärtet worden. So ist ATP als Transmitter an der Entstehung der schnellen erregenden postsynaptischen Potentiale im autonomen Nervensystem beteiligt (Galligan *et al.*, 2000; Hoyle & Edwards, 1992). Desweiteren ist die Rolle von ATP als einer der Überträgerstoffe der NANC

Hemmung der glatten Muskulatur des Magen-Darmtrakts etabliert. ATP aktiviert purinerge Rezeptoren und moduliert dadurch z.B. "small conductance"  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle (SK-channel), die selektiv durch das Bienengift Apamin blockiert werden (Selemidis *et al.*, 1997).

#### **5.7.4 VIP**

Neuropeptid Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) wird zu den Komponenten der nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Transmitter, die eine Relaxation im Magen-Darmtrakt vermitteln, gezählt. VIP wird eine wichtige Rolle bei der deszendierenden inhibitorischen Komponente im intestinalen peristaltischen Reflex zugesprochen.

#### **5.7.5 PACAP**

Neben VIP ist auch das Adenylatzyklase Aktivierende Polypeptid der Hypophyse PACAP ("Pituitary Adenylat Cyclase Activating Polypeptide") an der neuronalen hemmenden Übertragung beteiligt und beide scheinen zusammen mit Stickstoffmonoxid die deszendierende Relaxation beim peristaltischen Reflex zu vermitteln (Grider, 1996; Murthy *et al.*, 1997). PACAP wurde erstmalig 1989 aus dem Hypothalamus des Schafes isoliert und seither in Neuronen des ENS bei vielen Spezies nachgewiesen (Shen *et al.*, 1992). PACAP aktiviert sowohl PACAP-spezifische als auch PACAP/VIP-Rezeptoren, in deren Folge es zu einer Modulation von Apamin-sensitiven und/oder Apamin-insensitiven Kaliumkanälen kommt (De Winter *et al.*, 1998). VIP wirkt über spezifische und unspezifische VIP-Rezeptoren, die zum Teil auch durch PACAP aktiviert werden können und im einen Verlauf Tetraethylammonium-sensitive Kaliumkanäle aktivieren (Schworer *et al.*, 1993).

## 5.8 Inhibitorische Neurotransmission in Gastrointestinaltrakt.

Es ist bekannt, dass die Hemmung in einzelne zeitlich zu differenzierende Phasen unterteilt werden kann. Nach elektrischer Stimulation der hemmenden Nervenzellen im ENS tritt eine biphasische Hemmung auf (Baccari *et al.*, 1990). Im Magen verschiedener Spezies vermittelt NO die initiale, transiente Hemmung, während VIP die länger anhaltende Hemmung vermittelt. Dies hängt mit der frequenzabhängigen Freisetzung der Transmitter zusammen. Im Magen führt eine elektrische Stimulation mit geringer Frequenz primär zu einer NO-Ausschüttung während hohe Stimulationsfrequenzen VIP freisetzen (D'Amato *et al.*, 1992; Grundy *et al.*, 1993; Briejer *et al.*, 1995; De Beurme & Lefebvre, 1988). Die Beteiligung der hemmend wirkenden Transmitter ist region- und speziesabhängig. Zum Beispiel vermittelt im unteren Oesophagusphinkter des Opossums NO die schnelle Hemmung nach elektrischer Feldstimulation die lang anhaltende Hemmung ist in dieser Region aber nicht durch VIP vermittelt (Shahin *et al.*, 2000). Im Zäkum des Meerschweinchens scheint NO nur an der langsamen Hemmung beteiligt zu sein (Maggi *et al.*, 1994). Im Kolon der Ratte vermittelt NO die lang anhaltende, ATP die schnelle Hemmung (Pluja *et al.*, 1999).

Die NO-Wirkung erfolgt Rezeptor unabhängig über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels mit nachfolgender Aktivierung von Kalium-Kanälen (Watson *et al.*, 1996a). Die nach elektrischer Stimulation des ENS auftretenden NO-vermittelte Hemmung kann durch substituierte Argininanaloge, wie N-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME), welche die NO-Synthese blockieren, aufgehoben werden. Die unter diesen Bedingungen verbleibende Hemmung der Muskulatur kann zum Teil durch das Bienengift Apamin blockiert werden. Apamin ist ein Blocker calciumabhängiger Kalium-Kanäle und antagonisiert daher die Wirkungen aller Neurotransmitter, die durch Aktivierung dieser Kanäle eine Muskelrelaxation induzieren. Lange Zeit wurde Apamin als selektiver Blocker der ATP-vermittelten Hemmung angesehen. Inzwischen ist jedoch erwiesen, dass auch PACAP- oder VIP-induzierte Hemmungen Apamin-sensitiv sind (Shuttleworth & Keef, 1995) (s. Abb 10).

Mehrere *in vitro* Studien am Dün- und Dickdarm weisen darauf hin, dass an der Hemmung der kontraktile Aktivität NO, VIP und Neurotransmitter, deren Wirkung über einen Apamin-sensitiven Mechanismus vermittelt werden, beteiligt sind (Miura *et al.*, 1992; Niiooka *et al.*, 1997; Zagorodnyuk *et al.*, 1996). Dabei scheint NO aber eher für die

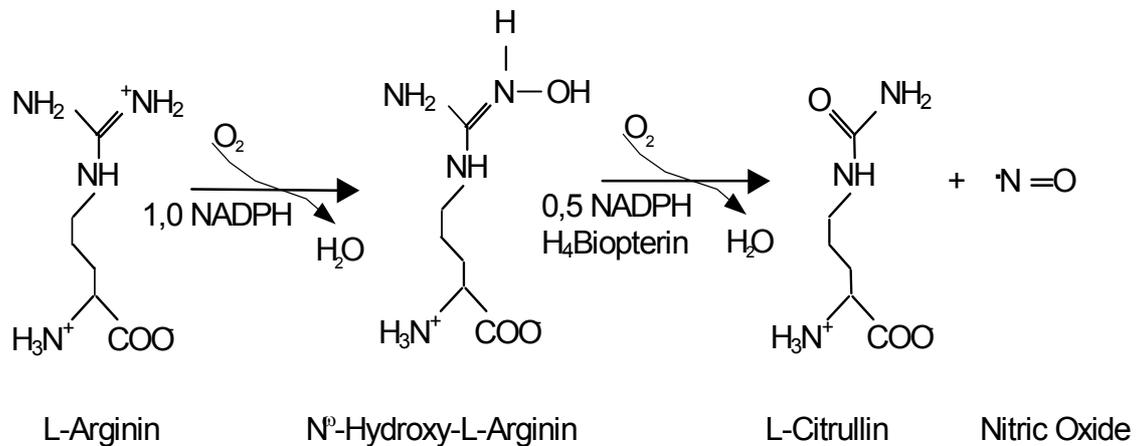
späte Hemmkomponente der biphasischen Inhibition verantwortlich zu sein, wohingegen Apamin-sensitive Mechanismen sowohl an der frühen, als auch an der späten Komponente der neuronal vermittelten Hemmung beteiligt sind (Barahona *et al.*, 1999; Bardou *et al.*, 2001; Murr *et al.*, 1999; Selemidis *et al.*, 1998).

## 5.9 Stickstoffmonoxid (NO)

Die Entdeckung des flüchtigen Gases als Botenstoff in verschiedensten Organsystemen liegt noch nicht lange zurück. In den 70er Jahren entdeckte Ferid Murad, dass das in der pektanginösen Therapie verwendete Nitroglycerin seine Wirkung über eine NO Freisetzung entfaltet. Unabhängig davon entdeckte Robert F. Furchgott die Bedeutung einer von den Endothelzellen freigesetzten Substanz bei der Blutdruckregulation. Er nannte die Substanz: Endothel Derived Relaxing Factor (EDRF). Mitte der 80 er Jahre schliesslich konnte Luis J. Ignarro (Ignarro *et al.*, 1987) zeigen, dass sie beiden Substanzen identisch sind. Eine Entdeckung, für die die drei Wissenschaftler mit dem 1998 vergebenen Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden.

### 5.9.1 Synthese und Metabolismus von NO

NO wird unter physiologischen Bedingungen durch NADPH-abhängige Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin freigesetzt (Bredt *et al.*, 1990; Pares-Herbute *et al.*, 1986). Katalysiert wird dieser Schritt durch die NO-Synthase (NOS) (s. Abb.35). Die NOS enthält eine Häm-Gruppe und zeigt in seiner Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten mit der Zytochrom P 450-Reduktase (Dichter *et al.*, 1990). Drei NOS-Isoformen sind bislang geklont worden, ein induzierbares Enzym (iNOS) (Teng *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1992), das  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig aktiviert wird, und zwei durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex aktivierte



**Abbildung 35:** Die initiale Hydroxylierung des L-Arginins zu N<sup>o</sup>-Hydroxy-L-Arginin benötigt für den Elektronentransfer 1.0 M NADPH. Im nächsten Schritt, der Entstehung von NO und L-Citrullin, werden weiter 0.5 M NADPH und auch Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) verbraucht.

konstitutive Formen (cNOS), die endotheliale NOS (eNOS) (Marsden *et al.*, 1992) und die neuronale NOS (nNOS) (Bredt *et al.*, 1990). Die NO-Synthese durch die konstitutiven NOS-Isoformen ist fest in ein regulatorisches Signalsystem eingebunden, das eine schnelle Aktivierung und Deaktivierung der NO-Synthese erlaubt, während die NO-Synthese durch die iNOS nach deren Induktion über Stunden bis Tage anhält und NO-Konzentration im mikromolaren Bereich erzeugt, was weit über die durch die cNOS-Formen zum Zweck der Signaltransduktion erreichten lokalen NO-Konzentrationen hinausgeht (Dichter *et al.*, 1990). Alternatives Splicing der nNOS-mRNA am 5'-Ende führt zur Expression von drei, am Aminoterminus unterschiedlichen Varianten der nNOS, die zunächst im ZNS als nNOS $\alpha$ , nNOS $\beta$  und nNOS $\gamma$  charakterisiert worden sind (Cobbs *et al.*, 1995; Eliasson *et al.*, 1997). nNOS $\alpha$  enthält als einzige nNOS-Variante eine PDZ-Domäne, die die Interaktion des Enzyms mit membranständigen Strukturen im Bereich der PSD (postsynaptic density)-Region wie beispielsweise PSD-95 (post synaptic density protein 95) und  $\alpha$ -Syntrophin ermöglicht, was und auf die Membranbindung der nNOS $\alpha$

hinweist, während nNOS $\beta$  und nNOS $\gamma$  keine geeigneten Verankerungsstrukturen besitzen und im Zytosol lokalisiert sind. Die Anbindung der nNOS an PSD 95 durch die PDZ-Domäne, deren genetischer Code auf sich auf Exon-2 des nNOS-Gens befindet, ermöglicht beispielsweise die funktionelle Koppelung der nNOS $\alpha$  an NMDA-Rezeptoren, was im ZNS grosse pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung ischämischer Gewebsschäden hat (Samdani *et al.*, 1997). Auch im Gastrointestinaltrakt von Ratte und Mensch ist die Expression der nNOS und ihrer Splice-Varianten nachgewiesen. Im Gastrointestinaltrakt des Menschen wurden insgesamt sechs 5'-Varianten der nNOS-messenger-RNA nachgewiesen, wovon drei für nNOS $\alpha$ , zwei für nNOS $\beta$  und eine für nNOS $\gamma$  kodieren (Saur *et al.*, 2000). In der gleichen Arbeit wurde eine dritte Exon 1-Variante (Exon 1<sub>5'3'</sub>) identifiziert, deren Promotorregion zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthält, deren Bedeutung für die Regulation der nNOS-Expression der Klärung bedarf.

### **5.9.2 Mechanismen der Signaltransduktion von Stickstoffmonoxid (NO)**

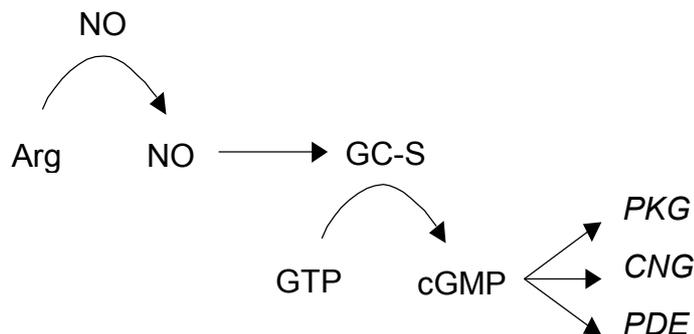
Die Effekte von NO sind vielfältig. NO kann direkt Ionenkanäle aktivieren (Bolotina *et al.*, 1994). Duridanova *et al.* konnten am Rattenmagenfundus zeigen, dass der Relaxation der glatten Muskulatur eine NO-vermittelte Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanäle vorausgeht (Duridanova & Boev, 1995). Eine weitere Möglichkeit wie NO seine Effekte entfalten kann, ist die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) wie von Burgstahler *et al.* an dem Cytosklett von Hepatozyten gezeigt (Burgstahler & Nathanson, 1995).

Die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (GC-S) (Elfvig & Lindh, 1982) stellt aber wahrscheinlich den zentralen Punkt der Signaltransduktion dar. Bartho *et al.* konnten zeigen, dass die inhibitorische Wirkung von Stickstoffmonoxid(NO) auf das Rattenileum über cGMP, als second messenger, vermittelt ist (Bartho & Lefebvre, 1995).

Die Aktivierung der GC-S und folglich die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels, erfolgt durch Bindung von NO an den Hämring der Guanylatzyklase (Archer *et al.*, 1994). Nicht nur Stickstoffmonoxid (NO) sondern auch andere Substanzen sind in der Lage die lösliche Guanylatzyklase zu aktivieren. Das hitzestabile Endotoxin von E.coli ist in der Lage durch Stimulation der GC-S eine Erhöhung des cGMP-Spiegels zu bewirken (Schulz *et al.*, 1992)..Die Guanylatcyclase ist aus zwei Untereinheiten (Subunits) aufgebaut. Bisher konnten je zwei dieser Subunits identifiziert werden.

Das zyklische GMP (cGMP) dient in seiner Form als second messenger zur Regulation von bisher drei bekannten, verschiedenen Effektorproteinen. Der cGMP-abhängigen Proteinkinasen, Ionenkanälen und Phosphodiesterasen. Diese vermitteln Protein-Phosphorylierung (Komalavilas & Lincoln, 1996), Kationeninflux über die Plasmamembran (Behar & Bianciani, 1987) und den Metabolismus von zyklischen Nukleotiden (Murthy *et al.*, 1993).

Zur Veranschaulichung der möglichen Ziele der Signalkette, welche durch NO stimuliert wird siehe (s. Abb 36). Die Proteinkinase G, eines der Ziele von cGMP, kommt in drei verschiedenen Isoformen vor, der  $\alpha$ ,  $\beta$  und II Variante. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen bestehen aus zwei Untereinheiten, die als Dimer das ruhende Enzym bilden.



**Abbildung 36: Der NO: cGMP Signaltransduktionsweg (Arg = Arginin, NOS = NO-Synthase, PKG = cGMP abhängige Proteinkinase, CNG = cGMP-abhängiger Ionenkanal, PDE = Phosphodiesterase).**

### 5.9.3 NOS-Inhibitoren

Ein wichtiger Schritt in der Aufklärung der Mechanismen und der physiologische Bedeutung war die Entdeckung der NOS-Inhibitoren.

Als erster Inhibitor wurde N(-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) synthetisiert, dem dann bald darauf andere folgten (N(-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME), N(-Nitro-L-Arginin (L-NNA)).

L-NNA ist die aktive Form des NOS-Inhibitors, L-NAME, welche sich durch enzymatische oder nicht-enzymatische Hydrolyse entsteht (Furfin *et al.*, 1997).

Schmidt *et al.* Verglichen (Schmidt *et al.*, 1995) die zwei NO-Antagonisten L-NNA und L-NAME und konnten zeigen, dass eine hohe Selektivität von L-NNA und L-NAME zur NOS bestanden, dass allerdings die Inhibition durch L-NNA die des Methylderivates bei weitem übersteigt.

Der Mechanismus der Inhibition beruht auf der Belegung der L-Argininbindungsstelle und der gleichzeitigen Blockade der NADPH-abhängigen Hämreduktion (Mayer & Andrew, 1998; Klatt *et al.*, 1994). Heinzl *et al.* konnten zeigen, dass durch Anwendung des NOS-Inhibitors L-NMA die NADPH-abhängige Hämreduktion nicht blockiert wird und es somit zu einer O<sub>2</sub>-Produktion, unabhängig von der NO-Synthese, kommt (Heinzl *et al.*, 1992). Darin sieht man auch die Überlegenheit der neueren NOS-Inhibitoren (L-NNA, L-NAME, s.o.) gegenüber L-NMA.

### 5.9.4 Lokalisation der NOS im Gastrointestinaltrakt

Der immunhistochemische Nachweis der NOS im Gastrointestinaltrakt erfolgte zunächst durch Nachweis der NADPH-Diaphoraseaktivität, die ein Charakteristikum der NO-Synthase darstellt (Ignarro *et al.*, 1990). In mehreren Studien konnte die Kolo-kalisation von NADPH-Diaphoraseaktivität und NOS-Expression bestätigt werden (Afework *et al.*; 1992; Mirabella *et al.*, 2000). Die Lokalisation von NOS-Isoformen wurde durch die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper möglich (Pollock *et al.*; 1993; Young *et al.*, 1997). NOS-positive Nervenzellkörper wurden in sämtlichen untersuchten Spezies einschliesslich Mensch in regional unterschiedlicher Dichte sowohl in myenterischen als

auch im submukösen Plexus identifiziert. In Tabelle 4 sind die wichtigsten Arbeit an verschiedenen Spezies aufgeführt.

**Tabelle 4: Immunhistochemisch Lokalisation der NOS im Gastrointestinaltrakt an verschiedenen Spezies.**

Ratte	Bredt <i>et al.</i> ,	1990
	Belai <i>et al.</i> ,	1992
	Aimi <i>et al.</i> ,	1993
	Forster & Southam,	1993
	Dawson & Dawson,	1996
Maus	Grozdanovic <i>et al.</i> ,	1992
Meerschweinchen	Llewellyn-Smith <i>et al.</i> ,	1981
	Costa <i>et al.</i> ,	1992
	Nichols <i>et al.</i> ,	1992
	Young <i>et al.</i> ,	1992
Hund	Ward <i>et al.</i> ,	1992
Schwein	Barbiers <i>et al.</i> ,	1993
	Krammer & Kuhnel,	1993
Mensch	Springall <i>et al.</i> ,	1992
	Faussone-Pellegrini <i>et al.</i> ,	1994

## 6 Spezielle Diskussion

Beobachtungen von Takahashi zeigen, dass sowohl die Anzahl NOS-positiver Neurone als auch die NOS-Aktivität im myenterischen Plexus im Kolon der Ratte von proximal nach distal abnimmt. Auch die durch elektrische Feldstimulation hervorgerufene Relaxation nahm von proximal nach distal ab. Diese Befunde könnten ein morphologisches und funktionelles Korrelat für die physiologische Rolle des proximalen Kolons als ein Organ für Lagerung und Entwässerung der Faeces darstellen (Takahashi & Owyang, 1998).

In dieser Studie wurde ferner nachgewiesen, dass die verminderte katalytische Aktivität der NOS im distalen Kolon für die geringere funktionelle Relevanz NO-abhängiger Mechanismen in dieser Region verantwortlich ist. Die Gesamtzahl myenterischer Neurone blieb dabei im gesamten Kolon unverändert, was im Western-Blot durch Nachweis der Expression von PGP 9.5 gezeigt wurde.

Regionale Unterschiede in der Relaxation des Dünndarms der Ratte wurden bereits in einer älteren Arbeit beschrieben (Nowak & Harrington, 1987). Auch diese Untersuchungen zeigten, dass in der glatten Muskulatur des proximalen Dünndarms signifikant grössere Relaxation auftrat als im distalen Dünndarm. Ob dieses Phänomen ein Ergebnis von Unterschieden im Aufbau des myenterische Plexus der verglichenen Regionen ist, wurde allerdings nicht untersucht und bleibt unklar.

Cholinerge Neuronen sind im enterischen Nervensystem reichlich vorhanden und spielen eine zentrale Rolle beim Vermitteln der Kontraktion. Auch die cholinerge Innervation unterscheidet sich zwischen dem proximalen und dem distalen Kolon, was bislang am Meerschweinchen nachgewiesen wurde. So wird Acetylcholin signifikant mehr im distalen Kolon als im proximal Kolon freigesetzt (Hasler *et al.*, 1990). Überdies sind die GM des distalen Kolons empfindlicher auf exogenem Acetylcholin als die des proximalen Kolon (Hasler *et al.*, 1990). Dies trägt möglicherweise zusammen mit der reduzierten nitrengen Innervation zu der physiologischen Rolle des distalen Kolons bei, den dehydrierten Kot mit heftigem peristaltischen Kontraktion anzutreiben (Ritchie, 1968). Im Gegensatz dazu ist die Rolle des proximalen Kolon eher, flüssigen Kot zu mischen und überzählige Flüssigkeit zu absorbieren. Diese Funktionen benötigen weniger heftige Muskelkontraktionen. Die vermehrte nitrege Innervation und eine erhöhte Empfindlichkeit

der GM des proximalen Kolon gegenüber NO kommen diesen funktionellen Anforderungen entgegen.

Über regionale Unterschiede in der Gesamtzahl myenterischer Neurone, im Verteilungsmuster myenterischer Ganglien, im Anteil NOS-positiver Neurone oder in der inhibitorischen Neurotransmission im Kolon der Maus lagen dagegen bislang keine Daten vor. Durch Etablierung einer speziellen Präparationstechnik, die die dreidimensionale Beurteilung von strukturell vollständig intakter Darmwand erlaubt, gelang es in dieser Arbeit erstmals, eine präzise morphologische und funktionelle Analyse des neuronalen Netzwerks des myenterischen Plexus des Dickdarms der Maus zu erstellen. Dabei zeigten sich deutliche regionale Unterschiede in der Gesamtzahl myenterischer Neurone pro Segment, wobei die höchste Neuronendichte im Bereich des proximalen Kolon, gefolgt vom distalen Kolon mit der geringsten Dichte im Zökum nachgewiesen wurde.

Im Rahmen dieser Untersuchung fiel zudem auf, dass im Bereich des proximalen Kolons der Maus zwei hypoganglionäre Regionen existieren, in denen die Strukturen des Primärplexus und des Sekundärplexus über eine Fläche von etwa 45 mm<sup>2</sup> enorm ausgedünnt sind, während die Fasernetzwerke des Tertiärplexus unverändert blieben. Diese Entdeckung schien besonders interessant, da eine derartige Lücke im myenterischen Plexus des Kolon bislang nie beschrieben worden war. Daher wurden weitere Mäusespezies mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund und auch das Kolon von Ratten untersucht. Auch im Kolon dieser Spezies fand sich an identischer Stelle das gleiche Phänomen. Diese hypoganglionäre Region ist anatomisch deutlich von den bei allen bekannten Modellen der Hirschsprung Erkrankung, wie beispielsweise der tödliche gefleckten Maus (Sandgren *et al.*, 1998), beschriebenen aganglionären Segmenten zu unterscheiden, bei denen nämlich auch die Strukturen des Teriärplexus fehlen. Außerdem sind die aganglionären Segmente bei den Modellen der Hirschsprung-Erkrankung vor allem im distalen Kolon zu finden und zirkulär angeordnet.

In Querschnitten fiel auf, dass im Bereich der hypoganglionären Region auch die Longitudinalmuskelschicht komplett fehlt. Histochemische Anfärbung von ICCs mit Xgal in Kit<sup>W-lacZ/+</sup> transgenen Mäusen zeigte, dass in dieser hypoganglionären Region. Auch die intramuskulären ICCs (IC-IM) fehlen, die normalerweise Bestandteil der LM sind.

Die funktionelle Bedeutung dieser oligoganglionären Region im proximalen Kolon ist unklar, allerdings könnte die unregelmässige Verteilung der LM in diesem Bereich zur Ausbildung flacher Aussackungen im proximalen Kolon führen, die eine Art Reservoirfunktion einnehmen könnten und auch bei der Pelletierung des Mäusekots von

Bedeutung sein könnten. Eine mögliche Erklärung dafür, dass diese doch sehr auffällige und konstant in allen untersuchten Tieren ausgebildete „Lücke“ noch nie beschrieben worden ist, könnte im benutzten Präparationsverfahren liegen. Bislang war es üblich, die Darmwand für mikroskopische Untersuchungen in Stücke zu schneiden. Eine Einschränkung dieses Verfahrens ist es folglich, dass anatomische Merkmale an den Rändern der Schnitte verloren werden. Eine zirkumferenzerhaltende dreidimensionale Präparation, bei der der Darm gefärbt wird, ohne dass anatomische Strukturen zerstört werden, sorgt für ein vollständigeres Bild des Darmrohres als flache Häutchen dies ermöglichen.

Um eine mögliche funktionelle Rolle dieser hypoganglionären Region zu charakterisieren, wurden elektrophysiologische Untersuchungen mittels intrazellulärer Ableitung in den benachbarten Regionen dieser oligoganglionären Areale durchgeführt und mit anderen Regionen des Kolons verglichen. Dabei zeigte sich beim Vergleich unterschiedlicher Regionen mit normal ausgebildetem MP deutliche Unterschiede in Grösse und Form der IJPs. Im Zökum fehlte die langsame Komponente der IJPs, im proximalen Kolon nahm die langsame Komponente von oral nach anal stufenweise ab. Die schnelle Komponente erreichte ihr Maximum im distalen Kolon. Die elektrischen Antworten waren insgesamt kongruent zu früher im Mäusekolon beschriebenen Antworten (Shuttleworth et al., 1997; Ward et al., 1997). Ableitungen von Zirkulärmuskelzellen aus dem Bereich der oligoganglionären Region zeigten überraschenderweise trotz des weitgehenden Fehlens von Nervenzellen in dieser Region komplett erhaltene IJPs, die sich weder in Form noch in Grösse von denen unterschieden, die im Bereich seitlich benachbarter Regionen mit normaler Anatomie des MPs abgeleitet wurden. Wurde allerdings die oligoganglionäre Region vor der elektrophysiologischen Ableitung durch Mikroinzisionen vom umgebenden Gewebe abgetrennt, liessen sich keine IJPs mehr registrieren. Dies lässt vermuten, dass durch den im Bereich der oligoganglionären Region erhaltenen Tertiärplexus eine suffiziente segmentale inhibitorische Innervation der Zirkulärmuskulatur gewährleistet wird, die durch Abtrennung der Nervenfasern des Tertiärplexus von den segmentalen Ganglienzellen verloren geht. Der Nachweis einer oligoganglionären Region innerhalb des proximalen Kolons der Maus zeigt deutlich, dass die seit mehr als einhundert Jahren vertretene Vorstellung, dass die Strukturen des myenterischen Plexus gleichförmig wie eine Art Netzstrumpf über das Darmrohr ausgebreitet sind und zwar regionenspezifische Unterschiede, jedoch keine relevante Heterogenität innerhalb eines Darmsegments aufweist, nicht generell zutrifft.

In der zökalen Zirkulärmuskulatur der Maus wurden im Rahmen dieser Arbeit IJPs nachgewiesen, die keine NO-abhängige Komponente aufwiesen, obwohl der MP auch im Zökum NOS-positive Neurone, wenn auch in vergleichsweise geringer Zahl, enthielt. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Beobachtungen von Young (Young et al., 1996), die eine NO-abhängige Relaxation von Zökum beschrieb. Dieser Gegensatz könnte allerdings auf unterschiedliche Stimulationstechniken zurückzuführen sein. Auch wenn in unserem Modell die Mikroelektrodenableitung von der serosalen Seite des Muskelstreifens durchgeführt wurde und somit wie in der Arbeit von Young Longitudinalmuskelzellen abgeleitet wurden, fanden wir im Zökum der Maus keine NO-abhängige Komponente der IJPs (Takahashi & Owyang, 1998).

Auch bei Stimulation mit höheren Stimulationsparametern, die denen aus der Studie von Young et. al entsprachen, konnten wir keine Hinweise für eine nitrege Komponente finden. Da in der Arbeit von Young et al. zirkuläre Muskulatur untersucht worden war, keine genauen Angaben über den Entnahmeort vorliegen und zudem die dort erhobenen Befunde nur sehr gering ausgeprägt waren, muß eine funktionelle nitrege Innervation im Zökum angezweifelt werden. Hier stellt sich dann jedoch die Frage, welche andere mögliche funktionelle Rolle die vorhandenen NADPH-positiven Neurone übernehmen.

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir regionale Unterschiede im Netz des enterischen Nervensystems im Mäusedickdarm nachgewiesen. Diese anatomischen Unterschiede gehen mit funktionellen Unterschieden der inhibitorischen nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Innervation dieser Regionen einher.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des enterischen Nervensystems im Rahmen der inhibitorischen Neurotransmission im Kolon der Maus *in vitro* zu determinieren. Zu diesem Zweck wurden elektrophysiologische und histochemische Verfahren verwendet, um die elektrophysiologischen Eigenschaften mit der Morphologie des myenterischen Plexus und dem Aufbau des Geflechts der Interstitial Cells of Cajal (ICC) vergleichen.

1. Tetrodotoxin, ein Blocker der neuronalen Übertragung, sowie ein Blocker  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{K}^{+}$ -Kanäle (Apamin) und ein NO-Synthase-Blocker (L-NNA) wurden untersucht. Hierbei konnte eine zentrale Rolle  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{K}^{+}$ -Kanäle bei der Entstehung der schnellen Komponente und eine Schlüsselrolle der nitrengen Neurotransmission bei der Generierung der langsamen Komponente inhibitorischen Junctionspotentiale (IJPs) aufgezeigt werden. Durch TTX wurden sämtliche IJPs vollständig geblockt, was deren neuronale Vermittlung nachwies.

2. Die Stimulation intrinsischer inhibitorischer Nerven löste TTX-sensitive IJPs in Zellen der zirkulären Muskelschicht aller untersuchten Präparate aus, die sich in Grösse und Form entlang der Längsachse des Kolon veränderten. Im Zökum zeigten sich monophasische IJPs von kurzer Dauer, die nur aus einer schnellen Komponente bestanden und durch L-NNA nicht beeinflusst wurden. Im oralen, mittleren und aboralen Teil des proximalen Kolon und im distalen Kolon erzeugten einzelne elektrische Feldstimuli IJPs, die aus einer L-NNA-insensitiven, schnellen Komponente und einer L-NNA-sensitiven, langsamen Komponente bestanden.

3. Die Ergebnisse histochemischer Untersuchungen zeigten eine Inhomogenität in Aufbau des myenterischen Plexus entlang des gesamten Mäusedickdarms. Die neuronale Dichte war im proximalen Kolon am größten und nahm in oraler und aboraler Richtung nach folgendem Muster ab: proximales Kolon > distales Kolon > Zökum.

4. Zusätzlich zeigte sich im proximalen Kolon eine bisher nicht beschriebene hypoganglionäre Region, die sich bei allen untersuchten Mäusestämmen und bei der

Ratte nachweisen ließ und die sich morphologisch und funktionell von den Nachbarregionen mit homogen ausgebildeten Nervenplexus unterschied.

5. Der neuronale Input zur Zirkulärmuskulatur im Bereich der hypoganglionären Region zeigte sich als segmental organisiert. Trennung dieser Region von ihrer Umgebung führte zum Verlust der neuronal-induzierten Antwort der Muskelzelle.

## 8 Verzeichnis Abbildungen

- Abbildung 1: Schematische Darstellung des gesamten Dickdarms der Maus. Abschnitt A - Zökum; B - proximales Kolon; C - distales Kolon. (in mm) ..... 11**
- Abbildung 2: Die Streifen der zirkulären und longitudinalen muskulären Schicht mit erhaltenem Plexus myentericus wurden mit Wolframs Nadeln (15, 25 µm Diameter) auf dem aus Sylgard ausgegossene Boden der elektrophysiologischen Kammer so fixiert, dass die zirkuläre Muskelschicht nach oben zeigte . Das Gewebe wurde konstant mit vorgewärmtem (37°C, pH 7.4) begasten KRP perfundiert. Kapillarglasmikroelektroden wurden gezogen, mit KCL (3 M) angefüllt (Resistenz 100-150 MΩ). Die Neuronen wurden durch ein Paar senkrecht zur zirkulären Muskelschicht plazierten Platinum-Iridium Elektroden stimuliert, die über eine Isolationseinheit mit einem Stimulator verbunden waren. Die zelluläre Antwort wurde gegen in organbadplazierte Ag-AgCl "Erdungs" Elektrode registriert und danach mit einem Verstärker verstärkt. Das analoge Ausgangssignal des Verstärkers wurde in digitale Form umgewandelt und auf dem PC mittels LABVIEW Version 5.0 gespeichert. .... 14**
- Abbildung 3: Unterteilung des IJPs in zwei Komponenten für Datenerfassung..... 18**
- Abbildung 4: Spontan-generierte Aktionspotentiale in ZM..... 22**
- Abbildung 5: Repräsentative Aufzeichnung der Membranpotentialänderung nach EFS. Die Stimulation intrinsischer inhibitorischer Nerven durch EFS löst ein inhibitorisches Junctionspotential (IJP) in Zellen der zirkulären Muskelschicht aus, das aus einer schnellen und langsamen Komponenten besteht. .... 23**
- Abbildung 6: Die durch EFS ausgelöste IJPs waren TTX ( $3 \times 10^{-6}M$ ) sensitiv, was eine neuronale Übertragung beweist..... 24**
- Abbildung 7: L-NNA ( $1 \times 10^{-4}M$ ), ein Blocker der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) nach 10 Minuten Anwendung eine leichte Depolarization ( $7.3 \pm 3.8$  mV, n=9) Membranpotentials und hemmt die langsame Komponente des IJP in Zellen der zirkulären Muskelschicht im proximalen Kolon (s. Abb. 6 mit vergrößerter Zeitskala). .... 26**
- Abbildung 8: Wirkung von L-NNA ( $1 \times 10^{-4}M$ ) auf die schnelle und langsame Komponente des IJP. L-NNA blockt die langsame Komponente vollständig hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die schnelle Komponente ( $25.0 \pm 8.7$  mV vs.  $29.0 \pm 9.5$  mV, n=12, n.s.). .... 26**
- Abbildung 9: Apamin ( $1 \times 10^{-6}M$ ), ein Blocker der kalziumabhängigen Kaliumkanäle reduziert die schnelle Komponente des IJP in Zellen der zirkulären Muskelschicht im proximalen Kolon. .... 28**

<b>Abbildung 10: Wirkung von Apamin (<math>1 \times 10^{-6} \text{M}</math>) auf schnelle und langsame Komponenten IJPs.....</b>	<b>28</b>
<b>Abbildung 11: Graphische Darstellung der Amplituden der schnellen und langsamen Komponenten des IJPs (mV) bei Stimulation mit Einzelimpuls in der ZM abgeleitet von verschiedenen Abschnitten entlang der Längsachse des Kolons....</b>	<b>31</b>
<b>Abbildung 12: Die langsame Komponente von IJPs bei Stimulation mit Einzelimpuls war maximal im oralen proximalen Kolon und nahm nach aboral hin ab (<math>13.6 \pm 2.0 \text{ mV}</math>, <math>10.3 \pm 3.0 \text{ mV}</math>, <math>7.3 \pm 1.7</math> and <math>3.8 \pm 1.5 \text{ mV}</math> für orales bzw. mittleres, aborales proximales Kolon und distales Kolon, <math>n=6</math>, <math>p&lt;0.05</math>). Im Zökum ergab EFS monophasische IJPs.....</b>	<b>32</b>
<b>Abbildung 13: Graphische Darstellung der Dauer der schnellen und langsamen Komponente der IJPs (ms) bei Stimulation mit Einzelimpuls, abgeleitet in Zökum, proximalem und distalem Kolon. ....</b>	<b>33</b>
<b>Abbildung 14: Stimulation intrinsischer Nerven löste TTX-sensitive IJPs in Zellen der zirkulären Muskelschicht aus. Im Zökum ergab EFS auch mit 1 Hz (10 Pulse) und 5 Hz (10 Pulse) nur monophasische IJPs, die von L-NNA nicht beeinflusst wurden. Im proximalen und distal Kolon löste EFS IJPs aus, die aus einer L-NNA-insensitiven schnellen Komponente und einer L-NNA-sensitiven langsamen Komponente bestehen.....</b>	<b>34</b>
<b>Abbildung 15: Graphische Darstellung der maximalen Amplitude der langsamen IJP-Komponente im Zökum, proximalem und distalem Kolon bei hoher Stimulationsintensität (10 Pulse mit 5Hz).....</b>	<b>35</b>
<b>Abbildung 16: Die NADPH-Diaphorase Färbung mit 3D- erhaltende anatomische Struktur des enterischen Nervensystems, zeigte im proximalen Kolon eine antimesenterielle (markiert) oligoganglionäre Region (3x15 mm). In diesem Bereich weist das Netzwerk der neuronalen Ganglien im myenterischen Plexus eine Lücke auf, Nervenfasern des tertiären Plexus sind dabei erhalten.....</b>	<b>37</b>
<b>Abbildung 17: Das gleiche Präparat aus Abb.16, seitlich.....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 18: Detaillierte Aufnahme der gleichen Präparate mit stärkerer Vergrößerung (<math>\times 9</math>).....</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 19: Methylenblau Vitalfärbung mit 3D erhaltende anatomische Struktur des enterischen Nervensystems, zeigt im proximalen Kolon die gleiche oligoganglionäre Region (markiert) wie bei NADPH-Diaphorase Färbung.....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildung 20: Die Cuprolinic blue Färbung mit 3D erhaltender anatomischer Struktur des enterischen Nervensystems stellt keine neuronalen Zellsomata Strukturen im Bereich der oligoganglionären Region dar. ....</b>	<b>42</b>

<b>Abbildung 21: Diese Abbildung zeigt das Auseinanderweichen der LM. Gefüllte Pfeile weisen auf die mesenterielle - offene auf die antimesenterielle Region. Mesenterielter Rand ist mit Asteriks gekennzeichnet. ....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 22: a Übersicht und Details in mittlerer b,c und hoher d,e Vergrößerung eines Querschnittes durch das proximale Kolon (Hämatoxylin-Eosin-Färbung). d,e: Zwischen zirkulärer (C) und longitudinaler Muskelschicht (L) stellen sich Ganglien des myenterische Plexus (MP) dar, die in den hypoganglionären Regionen d fehlen. Die longitudinale Muskelschicht (L) fehlt in den hypoganglionären Regionen antimesenterieell und mesenterieell. In diesen Regionen wird der zirkuläre Muskelschicht (C) nur von Serosa abgedeckt. ....</b>	<b>44</b>
<b>Abbildung 23: Methylenblau (C und D) und LacZ (A und B) dargestellte Präparate des proximalen Kolon zeigen fehlende ICC-IM. ....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 24: Abschnitte von makroskopischen und mikroskopischen Präparaten von Zökum (A); ileozökalen Übergang (B); proximalen Kolon mit oligoganglionären Bereich (C); distalen Kolon (D).....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 25: Whole-mounts mit NADPH-Diaphorase-Färbung(A), Methylenblau Vitalfärbung (B) und Färbung mit Cuprolinic blue (C) zeigten im proximalen Kolon die gleiche oligoganglionäre Region. ....</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 26: Verteilung von myenterischen Ganglia entlang des Dickdarms der Maus gerechnet pro mm<sup>2</sup> Oberfläche. ....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 27: Die Zahl von myenterischen Neuronen gefärbt mit Cuprolinic Blue (dunkelblaue Säulen) und NADPH-positive Neuronen (hellblaue Säule) gerechnet pro ein myenterischen Ganglion. ....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 28: Gesamte Zahl von myenterischen Neuronen gefärbt mit Cuprolinic Blue (dunkelblaue Säulen) und NADPH-positive Neuronen (hellblaue Säule) gerechnet pro Segment. Die Neuronenzahl im aboralen Segment entspricht dem „Mittelwert“ aus dem oligoganglionären Bereich und dem aus neuronenenreichen Randbereich.....</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 29: Originalfoto eines Präparates mit Mikroschnitten von Seiten der oligoganglionären Region. NO positive Neurone des myenterischen Plexus sind mittels NADPH Diaphorase Färbung nach Abschluss der elektrophysiologischen Versuche dargestellt. IJPs aus Muskelzellen der oligoganglionären Region waren IJPs vergleichbar, die aus Muskelzellen der benachbarten ganglienreichen Region des gleichen Segments abgeleitet wurden (12.1±2.1mV vs. 13.1±2.1mV, n=6, n.s.). Erst Trennung der ganglienarmen von der –reichen Region des gleichen Segments löschte die IJPs im ganglienarmen Bereich nahezu vollständig aus (2.6±1.7 ganglienarm vs. 16.5±1.9mV ganglienreich, n=6). ....</b>	<b>54</b>

<b>Abbildung 30: IJPs aus Muskelzellen der oligoganglionären Region waren mit IJPs vergleichbar, die aus ganglienreichen Region abgeleitet wurden. Nach der Trennung der ganglienarmen von der -reichen Region bewirkte eine nahezu vollständige Aufhebung der IJPs im ganglienarmen Bereich (n=6).....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 31: Neurone des enteralen Nervensystems. Einteilung nach Dogiel in Typ I bis III. Alle Populationen sind im Plexus myentericus und submucosus vorhanden (nach Dogiel, 1899).....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 32: Elektrisches Verhalten enteraler Nervenzellen. Differenzierung der Neurone in ein (A) S / Typ 1 Neuron, das nach Depolarisation repetitiv Aktionspotentiale feuern kann, und (B) AH/Typ 2 Neuron, das nach einem Aktionspotential eine lange Nachhyperpolarisation zeigt (nach Wood, 1994).....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 33 Räumlicher Anordnung der ICC. ....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 34 Enterales Nervensystem. Der Plexus myentericus befindet sich zwischen der Längs- und Zirkulärmuskulatur des Magen-Darm-Trakts. Der Plexus submucosus ist zwischen Zirkulärmuskulatur und Mucosa lokalisiert (nach Furness &amp; Costa, 1980).....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 35: Die initiale Hydroxylierung des L-Arginins zu N<sup>o</sup>-Hydroxy-L-Arginin benötigt für den Elektronentransfer 1.0 M NADPH. Im nächsten Schritt, der Entstehung von NO und L-Citrullin , werden weiter 0.5 M NADPH und auch Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) verbraucht. ....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 36: Der NO: cGMP Signaltransduktionsweg (Arg = Arginin, NOS = NO-Synthase, PKG = cGMP abhängige Proteinkinase, CNG = cGMP-abhängiger Ionenkanal, PDE = Phosphodiesterase). ....</b>	<b>76</b>

## Verzeichnis Tabellen und Grafiken

<b>Tabelle 1: Dauer und Amplitude von schnelle und langsame Komponenten von IJP bei Stimulation mit Einzelimpuls zeigt ausgeprägte regionale Unterschied in der inhibitorische Neuroübertragung in ZM von Zökum, proximalen und distalen Kolon.</b> .....	<b>30</b>
<b>Tabelle 2: Verteilung NADPH positiver Neuronen im Zökum, oralen, mittleren, aboralen proximalen Kolon und distalen Kolon gerechnet durch der Zahl: der Ganglien pro mm<sup>2</sup>, Neuronen pro Ganglien, Neuronen pro mm<sup>2</sup> Oberfläche, Neuronen pro ein Segment mit 1mm Länge.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 3: Verteilung der mit Cuprolinic blue gefärbten Neuronen im Zökum, oralen, mittleren, aboralen proximalen Kolon und distalen Kolon gerechnet durch der Zahl: der Ganglien, Neuronen pro Ganglien, Neuronen pro mm<sup>2</sup> Oberfläche, Neuronen pro ein Segment mit 1mm Länge. ....</b>	<b>49</b>
<b>Tabelle 4: Immunhistochemisch Lokalisation der NOS im Gastrointestinaltrakt an verschiedenen Spezies. ....</b>	<b>78</b>

## 9 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Univ. Prof. Dr. Drs.h.c M. Classen, sowie Prof. Dr. V. Schusdziarra danken, dass sie mir die Möglichkeit gaben an der Klinik und insbesondere in den entsprechenden Labors zu arbeiten.

Besonderen Dank möchte ich Herrn apl. Prof. Dr.med. H.D. Allescher für die Überlassung des Themas aussprechen. Durch die Hingabe und die herausragende fachliche Kompetenz von Herrn Allescher, unter dessen Leitung eine Arbeitsgruppe entstanden ist, die neben der wissenschaftlichen Kompetenz auch durch ihre kollegiale und hilfsbereite Atmosphäre heraussticht, war es mir vergönnt meine Promotionsarbeit zu bewerkstelligen.

Des weiteren danke ich allen Beteiligten der Arbeitsgemeinschaft für Gastrointestinale Physiologie (GAP) und Prof. Neuhuber für den reichhaltigen Gedankenaustausch, sowie allen Mitarbeitern der Labors, für ihre tatkräftige Unterstützung.

Dank gebührt auch meiner Familie (Marina, Michael, Irina und Kolka), die geduldig die Fertigstellung ertragen haben.

## 10 Literaturliste

1. Afework, M., Tomlinson, A., Belai, A., & Burnstock, G. (1992). Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in rat adrenal gland. *Neuroreport* **3**, 893-896.
2. Aimi, Y., Kimura, H., Kinoshita, T., Minami, Y., Fujimura, M., & Vincent, S. R. (1993). Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. *Neuroscience* **53**, 553-560.
3. Archer, S. L., Huang, J. M., Hampl, V., Nelson, D. P., Shultz, P. J., & Weir, E. K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 7583-7587.
4. Auerbach L (1862). Über einen Plexus gangliosus myogastricus. *39er Jahr-Bericht u.Abh.d.Schlesischen Gesellsch.f.Vaterländ.Cult.* 103-104.
5. Baccari, M. C., Calamai, F., & Staderini, G. (1990). Non-adrenergic, non-cholinergic influences on rabbit gastric tone. *Funct.Neurol.* **5**, 197-199.
6. Balaskas, C., Saffrey, M. J., & Burnstock, G. (1995). Distribution and colocalization of NADPH-diaphorase activity, nitric oxide synthase immunoreactivity, and VIP immunoreactivity in the newly hatched chicken gut. *Anatomical Records* **243**, 10-18.
7. Barahona, M. V., Sanchez-Fortun, S., San Andres, M. D., Rodriguez, C., & San Andres, M. (1999). Involvement of cyclic GMP-dependent mechanism in the nitrenergic relaxation of the bovine oesophageal groove. *J Auton.Pharmacol.* **19**, 39-47.
8. Barajas-Lopez, C., Berezin, I., Daniel, E. E., & Huizinga, J. D. (1989). Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am.J.Physiol* **257**, C830-C835.
9. Barbiere, M., Timmermans, J. P., Scheuermann, D. W., Adriaensen, D., Mayer, B., & De Groodt-Lasseel, M. H. A. (1993). Distribution and morphological features of nitrenergic neurons in the porcine large intestine. *Histochemistry* **10010**, 27-34.
10. Bardou, M., Goirand, F., Marchand, S., Rouget, C., Devillier, P., Dumas, J. P., Morcillo, E. J., Rochette, L., & Dumas, M. (2001). Hypoxic vasoconstriction of rat

main pulmonary artery: role of endogenous nitric oxide, potassium channels, and phosphodiesterase inhibition. *J Cardiovasc.Pharmacol.* **38**, 325-334.

11. Bartho, L. & Lefebvre, R. A. (1995). Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. *Archive International Pharmacodynamics and Therapeutics* **329**, 53-66.
12. Bayliss, W. M. & Starling, E. H. (1900). The movements and innervation of the large intestine. *Journal of Physiology (London)* **26**, 107-118.
13. Behar, J. & Bianciani, P. (1987). Pharmacological characterization of excitatory and inhibitory cholecystinin receptors of the cat gallbladder and sphincter of Oddi. *Gastroenterology* **92**, 764-770.
14. Belai, A., Schmidt, H. H., Hoyle, C. H., Hassall, C. J., Saffrey, M. J., Moss, J., Forstermann, U., Murad, F., & Burnstock, G. (1992). Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. *Neuroscience Letters* **143**, 60-64.
15. Blatz, A. L. & Magleby, K. L. (1986). Single apamin-blocked Ca-activated K<sup>+</sup> channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* **323**, 718-720.
16. Boeckxstaens, G. E. & Pelckmans, P. A. (1997). Nitric oxide and the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *Comp Biochem.Physiol A Physiol* **118**, 925-937.
17. Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P., & Cohen, R. A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**, 850-853.
18. Bredt, D. S., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**, 768-770.
19. Bridgewater, M., Cunnane, T. C., & Brading, A. F. (1995). Characteristic features of inhibitory junction potentials evoked by single stimuli in the guinea-pig isolated taenia caeci. *J.Physiol* **485**, 145-155.
20. Briejer, M. R., Akkermans, L. M., Meulemans, A. L., Lefebvre, R. A., & Schuurkes, J. A. (1995). 5-HT-induced neurogenic relaxations of the guinea-pig proximal colon: investigation into the role of ATP and VIP in addition to nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **351**, 126-135.

21. Brookes, S. J., Song, Z. M., Steele, P. A., & Costa, M. (1992). Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Gastroenterology* **103**, 961-973.
22. Bult, H., Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordeans, F. H., Van Maercke, Y. M., & Herman, A. G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**, 346-347.
23. Burgstahler, A. D. & Nathanson, M. H. (1995). NO modulates the apicolateral cytoskeleton of isolated hepatocytes by a PKC-dependent, cGMP-independent mechanism. *American Journal of Physiology* **269**, G789-799.
24. Burns, A. J., Herbert, T. M., Ward, S. M., & Sanders, K. M. (1997). Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* **290**, 11-20.
25. Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D., & Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br.J Pharmacol.* **40**, 668-688.
26. Burnstock, G., Satchell, D. G., & Smythe, A. (1972). A comparison of the excitatory and inhibitory effects of NANC nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br J.Pharmacol* **46**, 234-242.
27. Cajal SR (1893). Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C R Soc Biol (Paris)* **5**, 217-223.
28. Chang, I. Y., Glasgow, N. J., Takayama, I., Horiguchi, K., Sanders, K. M., & Ward, S. M. (2001). Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *J.Physiol* **536**, 555-568.
29. Chenais, B., Yapo, A., Lepoivre, M., & Tenu, J. P. (1991). High-performance liquid chromatographic analysis of the unusual pathway of oxidation of L-arginine to citrulline and nitric oxide in mammalian cells. *J.Chromatogr.* **539**, 433-441.
30. Cheung, D. W. & Daniel, E. E. (1980). Comparative study of the smooth muscle layers of the rabbit duodenum. *J.Physiol* **309:13-27.**, 13-27.
31. Ciccocioppo, R., Onori, L., Messori, E., Candura, S. M., Coccini, T., & Tonini, M. (1994). Role of nitric oxide-dependent and -independent mechanisms in peristalsis

and accommodation in the rabbit distal colon. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **270**, 929-937.

32. Cobbs, C. S., Brenman, J. E., Aldape, K. D., Bredt, D. S., & Israel, M. A. (1995). Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* **55**, 727-730.
33. Cornelissen, W. B., de Laet, A. B., Kroese, A. B., Adriaensen, D. W., Van Bogaert, P. P., Scheuermann, D. W., & Timmermans, J. P. (1999). Species-dependent features of Dogiel type II neurones in the mammalian enteric nervous system. *Eur.J.Morphol.* **37**, 241-249.
34. Costa, M., Brookes, S. J., Waterman, S., & Mayo, R. (1992a). Enteric neuronal circuitry and transmitters controlling intestinal motor function. In *Advances in the innervation of the gastrointestinal tract*, eds. Holle, G. E. & Wood, J. D., pp. 115-124. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
35. Costa, M. & Furness, J. B. (1976). The peristaltic reflex: an analysis of the nerve pathways and their pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **294**, 47-60.
36. Costa, M., Furness, J. B., & Gibbins, I. L. (1986a). Chemical coding of enteric neurons. *Prog.Brain Res.* **68:217-39.**, 217-239.
37. Costa, M., Furness, J. B., & Humphreys, C. M. (1986b). Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **332**, 79-88.
38. Costa, M., Furness, J. B., Pompolo, S., Brookes, S. J., Bornstein, J. C., Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1992b). Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience Letters* **148**, 121-125.
39. Crist, J. R. & He, X. D. (1991). Noncholinergic membrane potential responses to transmural nerve stimulation in the guinea pig ileum. *Am.J.Physiol* **260**, G240-G249.
40. D'Amato, M., Curro, D., & Montuschi, P. (1992). Evidence for dual components in the non-adrenergic non- cholinergic relaxation in the rat gastric fundus: role of endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. *Journal of the Autonomic Nervous System* **37**, 175-186.

41. Daniel, E. E., Thomas, J., Ramnarain, M., Bowes, T. J., & Jury, J. (2001). Do gap junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle? *Neurogastroenterol.Motil.* **13**, 297-307.
42. Daniel, E. E. & Wang, Y. F. (1999). Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc.Res.Tech.* **47**, 309-320.
43. Daniel, E. E., Wang, Y. F., & Cayabyab, F. S. (1998). Role of gap junctions in structural arrangements of interstitial cells of Cajal and canine ileal smooth muscle. *Am J Physiol* **274**, G1125-G1141.
44. Dawson, T. M. & Dawson, V. L. (1996). Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Annu.Rev.Med.* **47**, http-1100/Z.
45. De Beurme, F. A. & Lefebvre, R. A. (1988). Vasoactive intestinal polypeptide as possible mediator of relaxation in the rat gastric fundus. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **40**, 711-715.
46. De Ponti, F., D'Angelo, L., Frigo, G. M., & Crema, A. (1989). Inhibitory effects of calcium channel blockers on intestinal motility in the dog. *Eur.J.Pharmacol.* **168**, 133-144.
47. De Winter, B. Y., Robberecht, P., Boeckxstaens, G. E., De Man, J. G., Moreels, T. G., Herman, A. G., & Pelckmans, P. A. (1998). Role of VIP1/PACAP receptors in postoperative ileus in rats. *British Journal of Pharmacology* **124**, 1181-1186.
48. Desai, K. M., Sessa, W. C., & Vane, J. R. (1991). Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* **351**, 477-479.
49. Dichter, M. A., Wang, H. L., & Reisine, T. (1990). Electrophysiological effects of somatostatin-14 and somatostatin-28 on mammalian central nervous system neurons. *Metabolism* **39**, 86-90.
50. Dickens, E. J., Edwards, F. R., & Hirst, G. D. (2001). Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach. *J.Physiol* **531**, 827-833.
51. Dogiel, A. S. (1899). Über den Bau der Ganglien in den Flechten des Darms und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch.Anat.Physiol.Anat* 130-158.

52. Duridanova, D. B. & Boev, K. K. (1995). Three components of potassium outward current in cells isolated from the circular layer of guinea-pig ileum. *Gen.Physiol Biophys.* **14**, 125-137.
53. Ekblad, E., Sjuve, R., Arner, A., & Sundler, F. (1998). Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. *Gut* **42**, 836-844.
54. Elfvin, L. G. & Lindh, B. (1982). A study of the extrinsic innervation of the guinea pig pylorus with the horseradish peroxidase tracing technique. *Journal of Comparative Neurology* **208**, 317-324.
55. Eliasson, M. J. L., Blackshaw, S., Schell, M. J., & Snyder, S. H. (1997). Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: Prominent functional localization in the brain. *Proceedings National Academy of Sciences USA* **94**, 3396-3401.
56. Faussonne-Pellegrini, M. S., Bacci, S., Pantalone, D., Cortesini, C., & Mayer, B. (1994). Nitric oxide synthase immunoreactivity in the human ileocecal region. *Neuroscience Letters* **170**, 261-265.
57. Faussonne-Pellegrini, M. S., Pantalone, D., & Cortesini, C. (1990). Smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and myenteric plexus interrelationships in the human colon. *Acta Anat.(Basel)* **139**, 31-44.
58. Forster, E. R. & Southam, E. (1993). The intrinsic and vagal extrinsic innervation of the rat stomach contains nitric oxide synthase. *Neuroreport.* **4**, 275-278.
59. Forstermann, U., Ishii, K., Gorsky, L. D., & Murad, F. (1989). The cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells synthesizes an EDRF- like substance that relaxes rabbit aorta. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **340**, 771-774.
60. Furfine, E. S., Carbine, K., Bunker, S., Tanoury, G., Harmon, M., Laubach, V., & Sherman, P. (1997). Potent inhibition of human neuronal nitric oxide synthase by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester results from containing N(G)-Nitro-L-arginine. *Life Sci* **60**, 1803-1809.
61. Furness, J. B. & Anderson, C. R. (1994). Origins of nerve terminals containing nitric oxide synthase in the guinea-pig coeliac ganglion. *Journal of the Autonomic Nervous System* **46**, 47-54.
62. Furness, J. B., Bornstein, J. C., Kunze, W. A., Bertrand, P. P., Kelly, H., & Thomas, E. A. (1996). Experimental basis for realistic large-scale computer simulation of the enteric nervous system. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **23**, 786-792.

63. Furness, J. B., Li, Z. S., Young, H. M., & Forstermann, U. (1994). Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res.* **277**, 139-149.
64. Gabella, G. (1979). Innervation of the gastrointestinal tract. *Int.Rev.Cytol.* **59**, 129-193.
65. Gabella, G. (1989). Development of smooth muscle: ultrastructural study of the chick embryo gizzard. *Anat.Embryol.(Berl)* **180**, 213-226.
66. Gabella, G. (1990). Intramural neurons in the urinary bladder of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* **261**, 231-237.
67. Galligan, J. J., LePard, K. J., Schneider, D. A., & Zhou, X. (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* **81**, 97-103.
68. Gershon, M. D. (1967). Inhibition of gastrointestinal movement by sympathetic nerve stimulation: the site of action. *J.Physiol* **189**, 317-327.
69. Grider, G. R. (1996). Interplay of somatostatin, opioid, and GABA neurons in the regulation of the peristaltic reflex. *American Journal of Physiology* **267**, 696-701.
70. Grozdanovic, Z., Baumgarten, H. G., & Bruning, G. (1992). Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. *Neuroscience* **48**, 225-235.
71. Grundy, D., Gharib-Naseri, M. K., & Hutson, D. (1993). Role of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in vagally mediated relaxation of the gastric corpus in the anaesthetized ferret. *Journal of the Autonomic Nervous System* **43**, 241-246.
72. Hafemann, D. R. (1971). Binding of radioactive tetrodotoxin to nerve membrane preparations. *Biochimica et Biophysica Acta* **266**, 548-556.
73. Hanani, M. & Freund, H. R. (2000). Interstitial cells of Cajal--their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol Scand.* **170**, 177-190.
74. Hasler, W. L., Kurosawa, S., & Chung, O. Y. (1990). Regional cholinergic differences between distal and proximal colonic myenteric plexus. *Am J Physiol* **258**, G404-G410.

75. Heinzl, B., John, M., Klatt, P., Böhme, P., & Mayer, B. (1992). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* **281**, 627-630.
76. Hillsley, K., Schemann, M., & Grundy, D. (1992). Alpha-adrenoreceptor modulation of neurally evoked circular muscle responses of the guinea pig stomach. *Journal of the Autonomic Nervous System* **40**, 57-62.
77. Hirst, G. D. S. & McKirdy, H. C. (1974). A nervous mechanism for descending inhibition in guinea-pig small intestine. *Journal of Physiology (London)* **238**, 129-143.
78. Hope, B. T. & Vincent, S. R. (1989). Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **37**, 653-661.
79. Horowitz, M., Maddox, A., Harding, P. E., Maddern, G. J., Chatterton, B. E., Wishart, J., & Sherman, D. J. C. (1987). Effect of cisapride on gastric and esophageal emptying in insulin-dependant diabetes mellitus. *Gastroenterology* **92**, 1899-1907.
80. Hoyle, C. H. & Edwards, G. A. (1992). Activation of P1- and P2Y-purinoceptors by ADP-ribose in the guinea-pig taenia coli, but not of P2X-purinoceptors in the vas deferens. *British Journal of Pharmacology* **107**, 367-374.
81. Huang, P. L., Dawson, T. M., Bredt, D. S., Snyder, S. H., & Fishman, M. C. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* **75**, 1273-1286.
82. Ignarro, L. J., Bush, P. A., Buga, G. M., & Rajfer, J. (1990). Neurotransmitter identity doubt. *Nature* **347**, 131-132.
83. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., & Woods, K. S. (1987). Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ.Res.* **60**, 82-92.
84. Klatt, P., Schmidt, K., Brunner, F., & Mayer, B. (1994). Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1674-1680.
85. Komalavilas, P. & Lincoln, T. M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* **271**, 21933-21938.

86. Komuro, T. (1999). Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc.Res.Tech.* **47**, 267-285.
87. Krammer, H. J. & Kuhnel, W. (1993). Topography of the enteric nervous system in Peyer's patches of the porcine small intestine. *Cell Tissue Res.* **272**, 267-272.
88. Langer, J. C., Berezin, I., & Daniel, E. E. (1995). Hypertrophic pyloric stenosis: ultrastructural abnormalities of enteric nerves and the interstitial cells of Cajal. *J Pediatr.Surg.* **30**, 1535-1543.
89. Langley, J. N. & Anderson H.K (1895). The innervation of the pelvic and adjoining viscera.IV. The internal generative organs. *J.Physiol.Lond* **19**, 122-130.
90. Llewellyn-Smith, I. J., Wilson, A. J., Furness, J. B., Costa, M., & Rush, R. A. (1981). Ultrastructural identification of noradrenergic axons and their distribution within the enteric plexuses of the guinea-pig small intestine. *J.Neurocytol.* **10** , 331-352.
91. Maggi, C. A. & Giuliani, S. (1993). Multiple inhibitory mechanisms mediate non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the guinea pig colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **347**, 630-647.
92. Maggi, C. A., Zagorodnyuk, V., & Giuliani, S. (1994). Tachykinin NK3 receptor mediates NANC hyperpolarization and relaxation via nitric oxide release in the circular muscle of the guinea-pig colon. *Regulatory Peptides* **53**, 259-274.
93. Marsden, P. A., Schappert, K. T., Chen, H. S., Flowers, M., Sundell, C. L., Wilcox, J. N., Lamas, S., & Michel, T. (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters* **307**, 287-293.
94. Mashimo, H., He, X. D., Huang, P. L., Fishman, M. C., & Goyal, R. K. (1996). Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *Journal of Clinical Investigations* **98**, 8-13.
95. Mayer, B. & Andrew, P. (1998). Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **358**, 127-133.
96. McConalogue, K. & Furness, J. B. (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab* **8**, 51-76.
97. Mirabella, N., Lamanna, C., Assisi, L., Botte, V., & Cecio, A. (2000). The relationships of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-d to nitric oxide

synthase, vasoactive intestinal polypeptide, galanin and pituitary adenylate activating polypeptide in pigeon gut neurons. *Neuroscience Letters* **293**, 147-151.

98. Miura, M., Belvisi, M. G., Stretton, C. D., Yacoub, M. H., & Barnes, P. J. (1992). Role of K<sup>+</sup> channels in the modulation of cholinergic neural responses in guinea-pig and human airways. *J Physiol* **455**, 1-15.
99. Murr, M. M., Balsiger, B. M., Farrugia, G., & Sarr, M. G. (1999). Role of nitric oxide, vasoactive intestinal polypeptide, and ATP in inhibitory neurotransmission in human jejunum. *J Surg Res* **84**, 8-12.
100. Murthy, K. S., Jin, J. G., Grider, J. R., & Makhlouf, G. M. (1997). Characterization of PACAP receptors and signaling pathways in rabbit gastric muscle cells. *American Journal of Physiology* **272**, G1391-G1399.
101. Murthy, K. S., Severi, C., Grider, J. R., & Makhlouf, G. M. (1993). Inhibition of IP<sub>3</sub> and IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization by cyclic nucleotides in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol* **264**, G967-G974.
102. Nichols, K., Krantis, A., & Staines, W. (1992). Histochemical localization of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular sites in the guinea-pig intestine. *Neuroscience* **51**, 791-799.
103. Niioka, S., Takeuchi, T., Kishi, M., Ishii, T., Nishio, H., Takewaki, T., & Hata, F. (1997). Nonadrenergic, noncholinergic relaxation in longitudinal muscle of rat jejunum. *Jpn.J Pharmacol.* **73**, 155-161.
104. Nishi, S. & North, R. A. (1973). Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J Physiol* **231**, 471-491.
105. Nowak, T. V. & Harrington, B. (1987). Evidence for diminished inhibitory neuromuscular transmission in distal small intestine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **240**, 381-387.
106. Ny, L., Pfeifer, A., Aszodi, A., Ahmad, M., Alm, P., Hedlund, H., Fässler, R., & Andersson, K. E. (2000). Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I. *British Journal of Pharmacology* **129**, 395-401.
107. Pares-Herbute, N., Tapia-Arancibia, L., Nathanson, J., & Astier, H. (1986). Effets de la forskoline et du VIP sur la liberation de somatostatine et le contenu en AMPc de neurones diencephalic de rat en culture. *C.R.Soc.Biol.Paris.* **180**, 545-550.

108. Pluja, L., Fernandez, E., & Jimenez, M. (1999). Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *British Journal of Pharmacology* **126**, 883-892.
109. Pollock, J. S., Nakane, M., Buttery, L. D. K., Martinez, A., Springall, D., Polak, J. M., Förstermann, U., & Murad, F. (1993). Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *American Journal of Physiology* **265**, C1379-C1387.
110. Rae, M. G., Khoji, M. A., & Keef, K. D. (1998). Modulation of cholinergic neuromuscular transmission by nitric oxide in canine colonic circular smooth muscle. *Am.J.Physiol* **275**, G1324-G1332.
111. Rand, M. J. & Li, C. G. (1995). Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu.Rev.Physiol.* **57**, 659-682.
112. Ritchie, J. A. (1968). Colonic motor activity and bowel function. I. Normal movement of contents. *Gut* **9**, 442-456.
113. Roman, V., Krecsmarik, M., Bagyanszki, M., & Fekete, E. E. (2001). Evaluation of the total number of myenteric neurons in the developing chicken gut using cuproinic blue histochemical staining and neurofilament immunocytochemistry. *Histochem.Cell Biol.* **116**, 241-246.
114. Samdani, A. F., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (1997). Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* **28**, 1283-1288.
115. Sanders, K. M. (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **111**, 492-515.
116. Sanders, K. M. & Smith, T. K. (1986). Enteric neural regulation of slow waves in circular muscle of the canine proximal colon. *J.Physiol* **377**, 297-313.
117. Sanders, K. M. & Ward, S. M. (1992). Nitric oxide as a mediator of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *American Journal of Physiology* **262**, G379-392.
118. Sanders, K. M., Ward, S. M., Thornbury, K. D., Dalziel, H. H., Westfall, D. P., & Carl, A. (1992). Nitric oxide as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Japanese Journal of Pharmacology* **58 Suppl 2**, 220P-225P.

119. Sandgren, K., Larsson, L. T., Ekelund, M., Robinsson, D., & Ekblad, E. (1998). Functional and morphological examination of ganglionic and aganglionic distal gut from the lethal spotted mouse. *Eur.J Pediatr.Surg.* **8**, 234-239.
120. Saur, D., Paehge, H., Schusdziarra, V., & Allescher, H. D. (2000). Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **118**, 849-858.
121. Schemann, M. & Grundy, D. (1992). Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. *Am.J.Physiol* **263**, G709-G718.
122. Schemann, M., Reiche, D., & Michel, K. (2001). Enteric pathways in the stomach. *Anatomical Records* **262**, 47-57.
123. Schemann, M., Sann, H., Schaaf, C., & Mader, M. (1993). Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am.J.Physiol* **265**, G1005-G1009.
124. Schmidt, K., List, B. M., Klatt, P., & Mayer, B. (1995). Characterization of neuronal amino acid transporters: Uptake of nitric oxide synthase inhibitors and implication for their biological effects. *Journal of Neurochemistry* **64**, 1469-1475.
125. Schulz, S., Chrisman, T. D., & Garbers, D. L. (1992). Cloning and expression of guanylin. Its existence in various mammalian tissues. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 16019-16021.
126. Schworer, H., Clemens, A., Katsoulis, S., Kohler, H., Creutzfeldt, W., & Schmidt, W. E. (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a potent modulator of human colonic motility. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **28**, 625-632.
127. Selemidis, S., Satchell, D. G., & Cocks, T. M. (1997). Evidence that NO acts as a redundant NANC inhibitory neurotransmitter in the guinea-pig isolated taenia coli. *British Journal of Pharmacology* **121**, 604-611.
128. Selemidis, S., Ziogas, J., & Cocks, T. M. (1998). Apamin- and nitric oxide-sensitive biphasic non-adrenergic non- cholinergic inhibitory junction potentials in the rat anococcygeus muscle. *J Physiol* **513 ( Pt 3)**, 835-844.
129. Shahin, W., Murray, J. A., Clark, E., & Conklin, J. L. (2000). Role of cGMP as a mediator of nerve-induced motor functions of the opossum esophagus. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **279**, G567-G574.

130. Shen, Z., Larsson, L. T., Malmfors, G., Absood, A., Hakanson, R., & Sundler, F. (1992). A novel neuropeptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), in human intestine: evidence for reduced content in Hirschsprung's disease. *Cell Tissue Res.* **269**, 369-374.
131. Shuttleworth, C. W., Conlon, S. B., & Sanders, K. M. (1997). Regulation of citrulline recycling in nitric-oxide-dependent neurotransmission in the murine proximal colon. *British Journal of Pharmacology*.
132. Shuttleworth, C. W. & Keef, K. D. (1995). Roles of peptides in enteric neuromuscular transmission. *Regulatory Peptides* **56**, 101-120.
133. Smith, T. K. & Robertson, W. J. (1998). Synchronous movements of the longitudinal and circular muscle during peristalsis in the isolated guinea-pig distal colon. *J.Physiol* **506**, 563-577.
134. Spencer, N., McCarron, S. L., & Smith, T. K. (1999a). Sympathetic inhibition of ascending and descending interneurons during the peristaltic reflex in the isolated guinea-pig distal colon. *J.Physiol* **519 Pt 2:539-50.**, 539-550.
135. Spencer, N., Walsh, M., & Smith, T. K. (1999b). Does the guinea-pig ileum obey the 'law of the intestine'? *J.Physiol* **517**, 889-898.
136. Springall, D. R., Riveros-Moreno, V., Buttery, L., Suburo, A., Bishop, A. E., Merrett, M., Moncada, S., & Polak, J. M. (1992). Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* **98**, 259-266.
137. Stach, W. (1981). The neuronal organization of the plexus myentericus (Auerbach) in the small intestine of the pig Type II-Neurone. *Z.Mikrosk.Anat.Forschung* **95**, 161-182.
138. Stark, M. E., Bauer, A. J., Sarr, M. G., & Szurszewski, J. H. (1993). Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. *Gastroenterology* **104**, 398-409.
139. Stark, M. E., Bauer, A. J., & Szursweski, J. H. (1991a). Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. *Journal of Physiology (London)* **444**, 743-761.
140. Stark, M. E., Bauer, A. J., & Szurszewski, J. H. Effect of nitric oxide on circular muscle of canine jejunum. *Gastroenterology* 100, A498. 1991b.  
Ref Type: Abstract

141. Stevens, R. J., Publicover, N. G., & Smith, T. K. (1999). Induction and organization of Ca<sup>2+</sup> waves by enteric neural reflexes. *Nature* **399**, 62-66.
142. Suzuki, N., Prosser, C. L., & Dahms, V. (1986). Boundary cells between longitudinal and circular layers: essential for electrical slow waves in cat intestine. *Am.J.Physiol* **250**, G287-G294.
143. Takahashi, T. & Owyang, C. (1998). Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. *Gastroenterology* **115**, 1504-1512.
144. Taxi, J. (1969). Morphological and cytochemical studies on the synapses in the autonomic nervous system. *Prog.Brain Res.* **31**, 5-20.
145. Teng, B., Murthy, K. S., Kuemmerle, J. F., Grider, J. R., Sase, K., Michel, T., & Makhlouf, G. M. (1998). Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **275**, G342-G351.
146. Thuneberg, L. & Peters, S. (2001). Toward a concept of stretch-coupling in smooth muscle. I. Anatomy of intestinal segmentation and sleeve contractions. *Anatomical Records* **262**, 110-124.
147. Tonini, M., Candura, M., Onori, L., Coccini, T., Manzo, L., & Rizzi, C. A. (1992). 5-Hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptor agonists facilitate cholinergic transmission in the circular muscle of guinea pig ileum: antagonism by tropisetron and DAU 6285. *Life Sciences* **50**, PL173-PL178.
148. Van Ginneken, C. J., De Smet, M. J., Van Meir, F. J., & Weyns, A. A. (1999). Microwave staining of enteric neurons using cuproinic blue (Quinolinic phthalocyanin) combined with enzyme histochemistry and peroxidase immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **47**, 13-22.
149. Vanderwinden, J. M., Rumessen, J. J., Bernex, F., Schiffmann, S. N., & Panthier, J. J. (2000). Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit(W-lacZ) mice. *Cell Tissue Res.* **302**, 155-170.
150. Vannucchi, M. G. (1999). Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc.Res.Tech.* **47**, 325-335.
151. Wang, X. Y., Sanders, K. M., & Ward, S. M. (1999). Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* **295**, 247-256.

152. Ward, S. M., Beckett, E. A., Wang, X., Baker, F., Khoji, M., & Sanders, K. M. (2000). Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *The Journal of Neuroscience* **20**, 1393-1403.
153. Ward, S. M., Harney, S. C., Bayguinov, J. R., McLaren, G. J., & Sanders, K. M. (1997). Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis. *J Physiol* **505**, 241-258.
154. Ward, S. M. & Sanders, K. M. (2001). Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anatomical Records* **262**, 125-135.
155. Ward, S. M., Xue, C., Shuttleworth, C. W., Bredt, D. S., Snyder, S. H., & Sanders, K. M. (1992). NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *Am.J.Physiol* **263**, G277-G284.
156. Waterman, S. A. & Costa, M. (1994). The role of enteric inhibitory motoneurons in peristalsis in the isolated guinea-pig small intestine. *J.Physiol* **477 ( Pt 3)**, 459-468.
157. Watson, M. J., Bywater, R. A., Taylor, G. S., & Lang, R. J. (1996a). Effects of nitric oxide (NO) and NO donors on the membrane conductance of circular smooth muscle cells of the guinea-pig proximal colon. *Br.J Pharmacol.* **118**, 1605-1614.
158. Watson, M. J., Lang, R. J., Bywater, R. A., & Taylor, G. S. (1996b). Characterization of the membrane conductance changes underlying the apamin-resistant NANC inhibitory junction potential in the guinea-pig proximal and distal colon. *Journal of the Autonomic Nervous System* **60**, 31-42.
159. Wood, J. D. (1979). Neurophysiology of the enteric nervous system. In *Integrative functions of the autonomic nervous system*, eds. Brooks, C. & Sato, A., pp. 177-193. University of Tokyo Press, Tokyo.
160. Wood, J. D. (1994). Application of classification schemes to the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* **48**, 17-29.
161. Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T., & Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225-228.
162. Young, H. M., Ciampoli, D., Johnson, P. J., & Stebbing, M. J. (1996). Inhibitory transmission to the longitudinal muscle of the mouse caecum is mediated largely by nitric oxide acting via soluble guanylyl cyclase. *J Auton.Nerv.Syst.* **61**, 103-108.

163. Young, H. M., Furness, J. B., Shuttleworth, C. W., Brett, D. S., & Snyder, S. H. (1992). Co-localization of nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining in neurons of the guinea-pig intestine. *Histochemistry* **97**, 375-378.
164. Young, H. M., O'Brien, A. J., Furness, J. B., Ciampoli, D., Hardwick, J. P., McCabe, T. J., Narayanasami, R., Masters, B. S., & Tracey, W. R. (1997). Relationships between NADPH diaphorase staining and neuronal, endothelial, and inducible nitric oxide synthase and cytochrome P450 reductase immunoreactivities in guinea-pig tissues. *Histochem. Cell Biol.* **107**, 19-29.
165. Zagorodnyuk, V., Santicoli, P., Maggi, C. A., & Giachetti, A. (1996). The possible role of ATP and PACAP as mediators of apaminsensitive NANC inhibitory junction potentials in circular muscle of guinea-pig colon. *British Journal of Pharmacology* **119**, 779-786.

## Lebenslauf

Name Sibaev Andrei

Geburtstag und -ort: 17. Juli 1961  
in Ulujanowsk, Russland

Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

Ehegatte: Sibaev Marina

Ausbildung: Sept. '68- Juli '78 Mittelschule mit Abschluss der allg.Hochschulreife  
Ulujanowsk, Russland.

Studium: Sept. '78- Jun. '84 Student der Humanmedizin der medizinische  
Hochschule Kasan, Russland. Abschluss mit Staatsexamens.  
Fachrichtung: Heilkunde, Qualifikation: Arzt.

Nov. '99-Nov.'00 Praktisches Jahr (1 Tertial in der Chirurgischen  
Klinik, Klinikum r.d.Isar, 2 Tertial I und II.Med.Klinik und Poliklinik  
Klinikum r.d.Isar 3 Tertial im Institut für Radiologie Klinikum r.d.Isar).  
19.11.99. 3 Staatsexamen an der TU München

Beruf: Oct.'84-Jul.'93 Wissenschaftlicher Mitarbeiter Zentrales  
Wissenschaftliches Forschungslabors an der staatlichen medizinischen  
Hochschule Kasan Russland-

Sept.'93-Nov'95 Arzt-Toxikologe beim staatlichen Komitees für  
Sanitätsepidemiologieaufsicht der Republik Tatarstan. Kasan.

Dez.-99 Arzt im Praktikum, II Medizinische Klinik, Klinikum r.d. Isar

Juni`01-Jan`02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei TU München.

Jan`02-Aug`02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an Farmazeutisches  
Institut Universität Tübingen.

Seit Sept`02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei TU München.