

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

(Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. Drs. h.c. (Univ. Istanbul/Türkei, UMF lassy, Univ. Athen) M. Classen, i.R.)

Autonome Modulation der extrinsischen Innervation des Rattenösophagus

Fabian Geisler

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. (Komm. Direktor) Dr. Drs. h.c. (Univ.
Istanbul/Türkei, UMF lassy, Univ. Athen) M. Classen, i. R.

Die Dissertation wurde am 19.07.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 09.01.2002 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
<hr/>	
2. MATERIAL UND METHODEN	4
<hr/>	
2.1 VERSUCHSTIERE	4
2.2 VERSUCHSANORDNUNG	5
2.2.1 Transmurale elektrische Stimulation (TES)	5
2.2.2 Elektrische Nervus vagus-Stimulation (ENVS)	5
2.3 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	7
2.3.1 Transmurale elektrische Stimulation	7
2.3.1.1 Charakterisierung der Kontraktionsantwort durch verschiedene Blockersubstanzen	7
2.3.1.2 Einfluß der Modulation des NO-cGMP-Signaltransduktionsweges auf die TES	8
2.3.2 Elektrische Nervus vagus-Stimulation	8
2.3.2.1 Charakterisierung der Kontraktionsantworten nach ENVS mittels verschiedener Stimulationsparameter	8
2.3.2.2 Charakterisierung der Kontraktionsantworten nach ENVS mittels verschiedener pharmakologischer Substanzen	9
2.3.2.3 Einfluß putativer Transmitter des ENS auf die Kontraktionsantwort nach ENVS	9
2.3.2.4 Einfluß von Opioiden auf die Kontraktionsantwort nach ENVS	10
2.3.2.5 Einfluß ganglionärer nikotinerger Agonisten auf die Kontraktionsantwort nach ENVS	11
2.4 VERWENDETE SUBSTANZEN	11
2.5 DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK	12
<hr/>	
3. ERGEBNISSE	14
<hr/>	
3.1. TRANSMURALE ELEKTRISCHE STIMULATION	14
3.1.1 Einfluß von TTX, Atropin, Tubocurarin und Pancuronium auf die Kontraktionsantwort nach TES	14
3.1.2 Einfluß von L-NNA, L-Arginin und ODQ auf die Kontraktionsantwort nach TES	16
3.2. ELEKTRISCHE NERVUS VAGUS-STIMULATION	17
3.2.1 Charakterisierung der Kontraktionsantwort nach ENVS mittels verschiedener Stimulationsparameter	18
3.2.2 Einfluß von Atropin, Hexamethonium, Tubocurarin und TTX auf die Kontraktionsantwort nach ENVS	20
3.2.3 Einfluß verschiedener Transmitter des enterischen Nervensystems auf die Kontraktionsantwort nach ENVS	23

3.2.3.1 Einfluß von Galanin, VIP und Serotonin	23
3.2.3.2 Einfluß von L-NNA, L-Arginin, ODQ und DEA-NO	26
3.2.3.3 Einfluß von Opioiden auf die Kontraktionsantwort nach ENVS	29
3.2.4 Einfluß der nikotinerger Agonisten DMPP und Epibatidin auf die Kontraktionsantwort nach ENVS	34
4. ALLGEMEINE DISKUSSION	38
4.1 ALLGEMEINER ANATOMISCHER AUFBAU DES ÖSOPHAGUS	38
4.2 DER SCHLUCKAKT	40
4.2.1 Orale und pharyngeale Phase	40
4.2.2 Ösophageale Phase	41
4.3 INNERVATION DES ÖSOPHAGUS	42
4.3.1 Extrinsische Innervation des Ösophagus	44
4.3.2 Intrinsische Innervation des Ösophagus	47
4.3.2.1 Myenterischer Plexus	47
4.3.2.2 MASH-1-„Knockout“-Mäuse	50
4.3.2.3 Rolle des myenterischen Plexus an der Koordination der Peristaltik bei Spezies mit gemischter Muskulatur in der Muscularis propria	52
4.3.2.4 Submuköser Plexus und Muscularis mucosae	56
4.4 ENTWICKLUNG UND BESONDERHEITEN DER QUERGESTREIFTEN MUSKULATUR DES ÖSOPHAGUS	57
5. SPEZIELLE DISKUSSION	60
5.1 CHARAKTERISIERUNG DER VERSUCHSMODELLE	60
5.1.1 Charakterisierung des Systems und der Kontraktionsantwort nach TES mittels TTX, Atropin, Tubocurarin und Pancuronium	60
5.1.2 Charakterisierung des Systems und der Kontraktionsantwort nach ENVS mittels verschiedener pharmakologischer Substanzen	61
5.2 EINFLUß MÖGLICHER TRANSMITTER DES ENS AUF DIE KONTRAKTIONSENTWORT NACH ENVS UND TES	64
5.2.1 Galanin	64
5.2.2 VIP	65
5.2.3 L-NNA, L-Arginin, ODQ und DEA-NO	67
5.2.4 Serotonin	69
5.2.5 Opiode	71
5.3 EINFLUß DER NIKOTINERGER AGONISTEN DMPP UND EPIBATIDIN AUF DIE KONTRAKTIONSENTWORT NACH ENVS	75
6. ZUSAMMENFASSUNG	80

7. LITERATURVERZEICHNIS	83
8. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	93
9. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	97
10. DANKSAGUNG	100

1. Einleitung

Der Schluckakt gliedert sich in eine willkürlich auslösbare orale Phase sowie eine reflektorisch ablaufende pharyngeale und ösophageale Phase. Während der ösophagealen Phase wird der Bolus durch propulsive peristaltische Wellen der Muscularis propria in wenigen Sekunden in den Magen befördert; dabei wird diese Peristaltik durch extrinsische Neurone des Nervus vagus, deren Kerngebiete in der Medulla oblongata liegen, ausgelöst. Die meisten Säugetiere besitzen eine Muscularis propria, die in ihrer gesamten Länge aus quergestreifter Muskulatur besteht (Nagetiere, Wiederkäuer, Elefant, Giraffe u.a.), dagegen findet man bei einigen Spezies (Mensch, Katze, Oppossum) quergestreifte Muskulatur nur im oberen Drittel der Speiseröhre, die sich nach distal mit glatten Muskelfasern vermischt und im unteren Drittel vollständig durch glatte Muskulatur ersetzt wird. Dabei erfolgt die extrinsische Innervation der Muskulatur des Ösophagus durch den Nervus vagus entweder direkt, via somatomotorischer cholinergischer Neurone, die ohne synaptische Verschaltung mit der quergestreiften Muskulatur der Muscularis propria motorische Endplatten ausbilden (Gruber, H. 1968, S.236ff; Conklin, J. L. et al. 1994, S.918; Neuhuber, W. L. et al. 1998, S.96) oder indirekt, via viszeromotorischer cholinergischer Neurone, die in den Ganglien des enterischen Nervensystems (Plexus myentericus und submucosus) verschaltet werden, um die glatten Muskelfasern der Muscularis propria oder der Tunica muscularis mucosae zu innervieren (Kamikawa, Y. et al. 1979, S.229; Bieger, D. et al. 1985, S.104; Conklin, J. L. et al. 1994, S.918).

Sowohl in den Abschnitten des Ösophagus mit ausschließlich quergestreifter Muskulatur als auch in den Abschnitten mit glatter Muskulatur in der Muscularis propria sind Ganglien des myenterischen Plexus fester Bestandteil des Wandaufbaus des Ösophagus. Die Bedeutung der myenterischen Ganglien zwischen den Schichten der quergestreiften Muskulatur erscheint insofern rätselhaft, da nach heutigem Verständnis die Peristaltik der quergestreiften Muskulatur der Speiseröhre in einem medullären neuronalen Netzwerk vorprogrammiert ist, welches durch vagovagale Reflexbögen moduliert wird oder in Form der sekundären Peristaltik direkt durch lokale Stimuli durch vagovagale Reflexe ausgelöst wird (Bieger, D. 1993, S.203; Lu, W. Y. et al. 1998, S.R1434); in beiden Fällen erachtet man Strukturen in der Medulla oblongata als Schrittmacher und Koordinator der rhythmischen Peristaltik der quergestreiften Muskulatur, wobei eine direkte Beteiligung der myenterischen Ganglien an der Steuerung des Schluckvorgangs nicht zu bestehen scheint.

Gruber erkannte in den 60-iger Jahren ultrastrukturelle Unterschiede zwischen den Axonen an den motorischen Endplatten des Rattenösophagus, dessen Muscularis propria gänzlich aus quergestreifter Muskulatur besteht, und stellte als erster die These einer Art Koinnervation der quergestreiften Muskulatur durch myenterische Neurone auf (Gruber, H. 1968, S.236ff; Gruber, H. 1978b, S.51). Kürzlich griffen Neuhuber et al. die Frage nach einer möglichen Koinnervation der quergestreiften Muskulatur mit Hilfe von modernen immunhistochemischen Untersuchungsmethoden wieder auf und beschrieben nNOS/NADPH-d/Galanin/VIP-positive myenterische Neurone in der Muscularis propria der Ratte, deren Nervenendigungen unmittelbare Nachbarschaft zum einen zu den motorischen Endplatten des Sarkolemmis der quergestreiften Muskulatur, zum anderen zu den Nervenendigungen der vagalen Motoraxone zeigten (Neuhuber, W. L. et al. 1994, S.24ff; Worl, J. et al. 1994, S.230; Worl, J. et al. 1997, S. 114ff; Worl, J. et al. 1998, S.455). Bis zu 80 % der motorischen Endplatten wiesen eine solche zumindest morphologische Koinnervation durch myenterische Neurone auf, ohne signifikanten Unterschied zwischen longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht. Diese Erkenntnisse stellen die Auffassung einer einfachen, für die Skelettmuskulatur typischen monosynaptischen Innervation nach dem „alles oder nichts-Prinzip“ in Frage und legen eine periphere Modulation der cholinergen Neurotransmission durch enterische Neurone des myenterischen Plexus nahe. Die funktionelle Bedeutung dieser anatomischen Koinnervation ist bis heute ungeklärt.

Im Gegensatz zur Muscularis propria, die als eigentliche „treibende Kraft“ peristaltischer Kontraktionen der Speiseröhre erachtet wird, ist die Funktion der Tunica muscularis mucosae (TMM) unklar. Die TMM ist eine longitudinale Schicht glatter Muskelzellen an der Grenze zur Submukosa und erstreckt sich wie ein innerer muskulärer Schlauch entlang des gesamten Ösophagus. Die TMM wird durch intrinsische cholinerge Neurone des enterischen Nervensystems (ENS) innerviert, die wiederum Projektionen von extrinsischen Nervenfasern des N. vagus erhalten. Neben diesen intrinsischen cholinergen Neuronen, welche die Kontraktionen der TMM nach z.B. vagaler Stimulation vermitteln (Bieger, D. et al. 1985, S.100), weisen immunhistochemische Befunde auf die Existenz einer Vielzahl möglicher Neurotransmitter wie z.B. VIP, Substanz P, Somatostatin, Opioide oder NO in den Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus der Ratte hin, welche die Kontraktilität der TMM beeinflussen könnten (Schultzberg, M. et al. 1980, S.723-728; Worl, J. et al. 1994, S.231). Darüberhinaus gelang es, unter bestimmten Versuchsbedingungen in vitro nach elektrischer Stimulation enterischer Nervenfasern eine Relaxationsantwort der TMM zu demaskieren (Akbarali, H. I. et al. 1986, S.98; Will, S. et al. 1990, S.2420), was zusätzlich zur

exzitatorischen vagalen Innervation auch auf eine inhibitorische Innervation durch das ENS hinweist. Die chemische Natur und Bedeutung dieser inhibitorischen Komponente ist bisher nicht geklärt, deutet aber auf eine mögliche Interaktion extrinsischer und intrinsischer Neurone an der Steuerung der Kontraktilität der TMM hin.

Die speziellen Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung einer möglichen autonomen Modulation der vagalen Innervation der quergestreiften Muscularis propria und der glattmuskulären TMM des Rattenösophagus durch das ENS waren:

- a) Die Etablierung eines *in vitro* Organbadsystems zur Untersuchung des Einflusses von elektrischer transmuraler und vagaler Stimulation auf die Kontraktilität des Rattenösophagus.
- b) Die Kontraktionsantworten der quergestreiften Muscularis propria und der glattmuskulären TMM anhand der Kurvenverläufe genau zu differenzieren.
- c) Die Charakterisierung der extrinsischen Innervation der Muscularis propria und der TMM mittels verschiedener pharmakologischer Substanzen (Atropin, Tubocurarin, Hexamethonium, TTX) und verschieden gewählter Stimulationsparameter.
- d) Die Untersuchung des Einflusses möglicher Transmitter des ENS auf die Kontraktilität der quergestreiften und glatten Muskulatur nach vagaler bzw. transmuraler Stimulation, *inter alia*: Galanin, VIP, NO, Serotonin und Opioide.
- e) Die Untersuchung des Einflusses der ganglionären nikotinergen Agonisten DMPP und Epibatidin auf die Kontraktilität der quergestreiften und glatten Muskulatur nach vagaler Stimulation.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an nüchternen, männlichen Wistar-Ratten der Firma Charles River mit einem Gewicht zwischen 300 g und 350 g durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden vor den Experimenten unter standardisierten Bedingungen in einem voll klimatisierten Raum bei künstlichem Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Ernährung bestand aus Trockenfutter und Wasser. Mindestens 14 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Versuchstieren das Futter entzogen.

Eingeleitet durch die inhalative Narkose von CO₂, erfolgte die Tötung der Tiere mittels intraperitonealer Injektion von Na-Pentobarbital (Narcoren[®]) in einer Dosierung von 100 mg/kg. Nach Eröffnen des Thorax und des Halses wurden die beiden Nn. vagi in ihrem zervikalen Verlauf schonend von den Aa. carotides und den Vv. jugulares freipräpariert. Nach Entfernen des Herzens wurde die Trachea mit dem anhängenden Lungenpaket unter besonderer Schonung der Nn. recurrentes und der thorakalen Anteile des N. vagus vom Ösophagus abpräpariert und der gesamte Ösophagus mit anhängenden Nn. vagi entnommen. Um die Region des unteren Ösophagussphinkters (UÖS) auszusparen, wurden 0,5 cm des aboralen Endes des Ösophagus entfernt und die Ösophagus-Vagus-Präparation in oxygenierter Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung bei 37°C inkubiert.

Für die Untersuchungen des Ösophagus mittels transmuraler elektrischer Stimulation wurden lediglich Muskelstreifen benötigt, was eine Präparation und Asservation der Nn. vagi nicht erforderlich machte.

2.2 Versuchsanordnung

2.2.1 Transmurale elektrische Stimulation (TES)

Pro Versuchstier wurden 3-4 intakte Segmente des Ösophagus mit einer Länge von 0,8-1,2 cm verwendet, wobei das jeweils kaudale Ende mit Hilfe eines Fadens an einem Haken eines Elektrodenhalters befestigt wurde und das orale Ende durch zwei zirkuläre Platinelektroden geführt wurde. Der Elektrodenhalter mit dem Ösophagussegment wurde in ein doppelwandiges Organbad plaziert, welches 4 ml einer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung (Krebs-Ringer-Solution, KRS) enthielt (NaCl 115,5 mM, MgSO₄ 1,16 mM, NaH₂PO₄ 1,16 mM, Glucose 11,1 mM, NaHCO₃ 21,9 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 4,16 mM) und mit Karbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast wurde. Die Temperatur wurde durch einen die Wand des Organbades durchfließenden Warmwasserkreislaufs auf 37°C konstant gehalten. Das orale Ende des Ösophagus wurde mit einem ca. 10 cm langen Faden mit einem Kraftwandler (Swegma Force Displacement Transducer SG 4-500, Swegma, Schweden) verbunden, der die Kraftentwicklung der Muskulatur des Ösophagusstreifens in longitudinaler Richtung isometrisch registrierte und in elektrische Impulse umwandelte, welche über einen Verstärker (TBM 4, Transbridge, USA) mit einem Schreiber (Rikadenki, Finnland) aufgezeichnet wurden. Die transmurale elektrische Stimulation (TES) der Muskelstreifen erfolgte mittels eines Stimulators (Grass, S-11, USA) via zweier zirkulärer Platinelektroden, die in ca. 1 cm Abstand am Elektrodenhalter angebracht waren.

Nach Anlegen einer Vorspannung von 1 g und einer Äquilibrationszeit von mindesten 30 min wurde das System mehrmals gespült und der Puffer erneuert, bevor die Versuche gestartet wurden. Die Versuchsdauer pro Ösophagussegment betrug maximal 1,5 h.

2.2.2 Elektrische Nervus vagus-Stimulation (ENVS)

Die elektrische Nervus vagus-Stimulation (ENVS) erfolgte am gesamten 4,5-5,5 cm langen Ösophagus mit anhängenden Nn. vagi, so daß der Versuchsansatz in einem entsprechend großen doppelwandigen Organbad von 120 ml Fassungsvermögen durchgeführt wurde. Das aborale Ende des Ösophagus wurde mittels eines Fadens an den Haken eines selbstgefertigten Elektrodenhalters angebracht und die beiden Enden der Nn. vagi um zwei bipolare hakenförmige Stimulationselektroden gelegt und ebenfalls mit einem Faden befestigt. Um

eine direkte Stimulation der Muskulatur zu vermeiden, wurde ein Abstand von mindestens 1,5 cm zwischen Stimulationselektroden und Ösophagus gewählt. Wie unter 2.2.1 wurde der Elektrodenhalter mit der Ösophagus-Vagus-Präparation in das doppelwandige Organbad plaziert, welches 100 ml KRS enthielt und bei 37°C mit Karbogen begast wurde. Das orale Ende des Ösophagus wurde mit einem ca. 10 cm langen Faden an einen isometrischen Kraftaufnehmer befestigt, der die Kontraktionen der Muskulatur des Ösophagus in longitudinaler Richtung registrierte. Verstärkung und Aufzeichnung der Signale geschahen analog der transmuralen Stimulation mit den dort verwendeten Geräten (siehe 2.2.1). Zur elektrischen Stimulation des N. vagus diente ebenfalls ein Grass S-11 Stimulator (Abb.1).

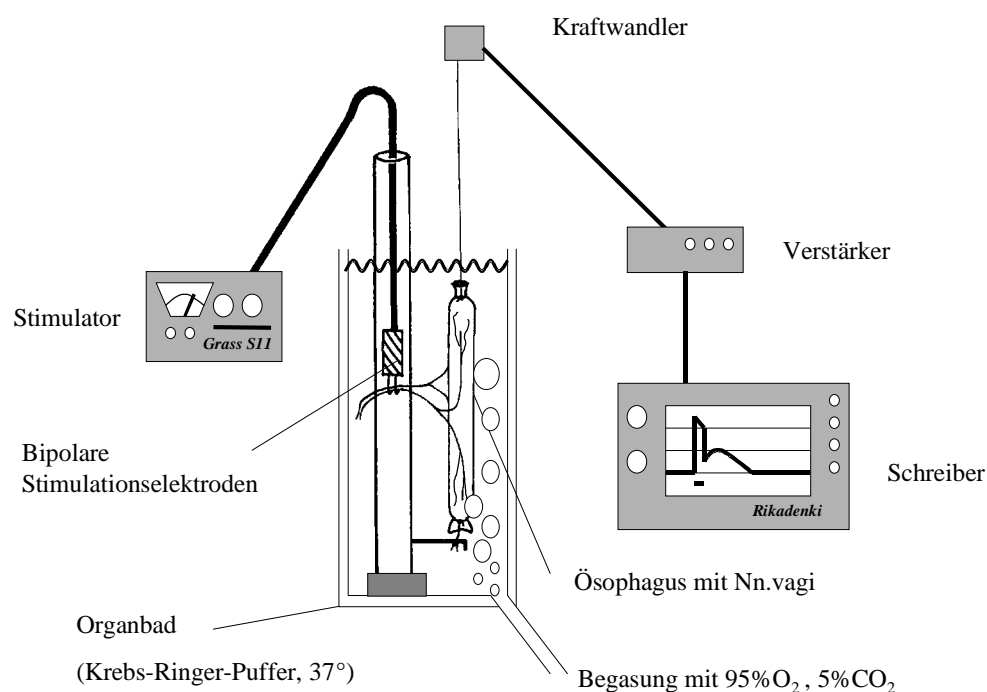


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Nervus vagus-Stimulation. Der isolierte Ösophagus wurde in ein beheiztes (37°), doppelwandiges Organbad mit KRS plaziert und mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast. Dabei wurde mittels eines Fadens das aborale Ende mit einem Elektrodenhalter, das orale Ende mit einem Kraftwandler verbunden. Die Nn. vagi wurden 1,5 cm vom Ösophagus entfernt an eine bipolare Stimulationselektrode befestigt und mittels eines Stimulators elektrisch stimuliert.

Bei einer Vorspannung von 1g wurde das System mindestens 30 min äquilibriert, und nach 3-maligem Spülen mit KRS wurden die Experimente begonnen. Die Experimente nach ENVS dauerten nicht länger als maximal 2 Stunden.

Sowohl bei der TES als auch bei der ENVS wurden jedes Muskelsegment bzw. jede Ösophagus-Vagus-Präparation lediglich für einen Versuchsansatz verwendet, wobei pro

Experiment das Gewebe von mindestens zwei Versuchstieren abstammte. Das jeweilige Gewebe diente als eigene Kontrolle.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Transmurale elektrische Stimulation

2.3.1.1 Charakterisierung der Kontraktionsantwort durch verschiedene Blockersubstanzen

Nach der Äquilibration des Gewebes erfolgte die transmurale Stimulation bei einer Spannung von 20 Volt, einer Impulsdauer von 0,2 ms und einer Pulsfrequenz von 0,1 Hz, d.h. das Muskelsegment wurde kontinuierlich in Abständen von 10 s periodisch mit einem Impuls stimuliert. Die Stimulationsparameter wurden bewußt niedrig gewählt, um eine direkte Stimulation der Muskulatur möglichst gering zu halten. Diese Parameter wurden bei allen Experimenten der transmuralen Stimulation beibehalten. Die elektrischen Stimuli lösten dabei ruckartige, eingipflige Kontraktionen („twitch“-Kontraktionen) aus, die sofort nach Beginn der Feldstimulation entstanden und mit der Beendigung des elektrischen Reizes sistierten und über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden in gleicher Stärke reproduzierbar waren.

Nachdem die so induzierten Kontraktionsantworten mindestens 10 min lang ein stabiles Niveau erreicht hatten, wurden die verwendeten Substanzen in das Organbad pipetiert ohne die Feldstimulation zu unterbrechen, um einen eventuellen Effekt genau verfolgen zu können. Die Charakterisierung des Systems geschah mit folgenden Substanzen: Tetrodotoxin (TTX, 10^{-6} M), als Blocker überwiegend neuronaler Na^+ -Kanäle, Atropin (10^{-6} M), als Antagonist muskarinergere Acetylcholinrezeptoren (Ach-Rezeptoren) und den beiden nikotinergen Blockern der neuromuskulären Übertragung an der motorischen Endplatte Tubocurarin (10^{-5} M) und Pancuronium (10^{-5} M). Die transmurale Stimulation wurde daraufhin entsprechend den Inkubationszeiten der o.g. Substanzen 10 min fortgesetzt, bevor die ermittelten Daten zur Auswertung herangezogen wurden.

2.3.1.2 Einfluß der Modulation des NO-cGMP-Signaltransduktionsweges auf die TES

Um den Einfluß verschiedener Substanzen auf die transmurale Stimulation zu untersuchen, die den Stickstoffmonoxid (NO)-cGMP-Signaltransduktionsweg beeinflussen, wurde das Ösophagussegment unter denselben Bedingungen wie unter 2.3.1.1 stimuliert. Nach Einstellen einer stabilen Kontraktionsantwort über einen Zeitraum von 10 min, wurden die auszutestenden Substanzen in das Organbad gegeben. Als kompetitiver und reversibler Inhibitor der NO-Synthase (NOS) wurde N⁰-Nitro-L-Arginin (L-NNA, 10⁻⁴ M) (Mayer, B. et al. 1998, S.129) zupipetiert und 15 min weiterstimuliert, bevor L-Arginin (10⁻³ M) als Substrat der NOS zugegeben wurde, um einen eventuellen L-NNA-Effekt zu antagonisieren. Die Feldstimulation wurde daraufhin noch 15 min weitergeführt. Desweiteren wurde der Einfluß von L-Arginin alleine und von ¹H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ), einem selektiven Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase (Lohse, M. J. et al. 1998, S.112), untersucht. Nach Zugabe von L-Arginin (10⁻³ M) bzw. ODQ (10⁻⁵ M) wurde die transmurale Stimulation noch weitere 15 min fortgesetzt.

2.3.2 Elektrische Nervus vagus-Stimulation

2.3.2.1 Charakterisierung der Kontraktionsantworten nach ENVS mittels verschiedener Stimulationsparameter

Zur Charakterisierung der Kontraktionsantwort des Ösophagus wurde der N. vagus mit einer Spannung von 40 V, einer Impulsdauer von 0,5 ms und einer Stimulationsdauer von 1000 ms stimuliert. Zunächst erfolgte die ENVS in zeitlichen Abständen von 2 min bei einer Pulsfrequenz von 1 Hz bis die Kontraktionsantwort stabil war (identische Kontraktionen nach wenigstens drei aufeinanderfolgender Stimuli), bevor die Pulsfrequenz zwischen 1 und 50 Hz variiert wurde (1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, und 50 Hz). Dabei kam es zur Auslösung einer biphasischen Kontraktion, die über mindestens 2 Stunden verlässlich reproduzierbar war und deren Komponenten jeweils der quergestreiften und der glatten Muskulatur entsprachen (siehe Ergebnisteil). Die Stimulationsintervalle betragen 2 min, wobei die vagale Stimulation in jedem Frequenzbereich 3-mal erfolgte.

Um eine direkte Stimulation der Muskulatur sicher auszuschließen, wurde im Anschluß an zwei Versuchsdurchläufe eine Vagotomie durchgeführt und anschließend nochmals mit einer Pulsfrequenz von 1-50 Hz stimuliert.

2.3.2.2 Charakterisierung der Kontraktionsantworten nach ENVS mittels verschiedener pharmakologischer Substanzen

Der Einfluß verschiedener pharmakologischer Substanzen auf die Kontraktionsantworten des Ösophagus nach ENVS wurde bei einer Stimulationsfrequenz von 20 Hz, einer Impulsdauer von 0,5 ms und einer Stimulationsdauer von 1000 ms untersucht. Eine Stimulationsfrequenz von 20 Hz wurde gewählt, da Reizungen in diesem Frequenzbereich mit Sicherheit zu einer tetanischen Kontraktion der quergestreiften Muskulatur führten und die Amplitude der Kontraktionsantwort der glatten Muskulatur verlässlich groß war, um einer quantitativen Analyse vor und nach Substanzzugabe zugänglich zu sein. Die Kontraktionskraft beider Antworten lag dabei im submaximalen Bereich. Eine Stimulationsdauer von 1000 ms wurde gewählt, weil längere Reizungen in Vorversuchen zu merklichen Überschneidungen der zu differenzierenden Kontraktionsantworten geführt hatten. Die so ausgelöste biphasische Kontraktionsantwort des Ösophagus war über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden reproduzierbar. Die vagale Reizung erfolgte kontinuierlich in Stimulationsintervallen von 2 min und nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus wurden die Substanzen in der Mitte eines Stimulationsintervalls (60 s nach der letzten bzw. vor der nächsten Stimulation) zupipettiert. Folgende Substanzen wurden verwendet, um die neuronale, ganglionäre und neuromuskuläre Übertragung in dem System zu untersuchen: TTX (10^{-6} M), Hexamethonium (10^{-4} M), Atropin (10^{-6} M) und Tubocurarin (10^{-5} M). Nach einer Inkubationszeit von jeweils 10 min wurde die vagale Stimulation abgebrochen und die ermittelten Daten ausgewertet.

2.3.2.3 Einfluß putativer Transmitter des ENS auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

Die Versuchsdurchführung zur Untersuchung des Einflusses möglicher Transmitter des enterischen Nervensystems auf die Kontraktionsantwort nach ENVS geschah mit denselben Stimulationsparametern wie unter 2.3.2.2, wobei wiederum der N. vagus in Abständen von 2

min kontinuierlich stimuliert wurde. Folgende Substanzen wurden zugegeben: Das 29-Aminosäuren-Peptid Galanin (10^{-8} M, 10^{-7} M) und das 28-Aminosäuren-Peptid Vasointestinales Polypeptid (VIP, 10^{-7} M), woraufhin noch 15 min weiterstimuliert wurde, bevor die jeweiligen Antagonisten Galanin 1-15 (2×10^{-7} M) bzw. VIP 10-28 (5×10^{-7} M) zupipetiert wurden, um die Spezifität einer eventuellen Wirkung der beiden Peptide nachzuweisen. Desweiteren wurde der Einfluß von Galanin 1-15 und VIP 10-28 ohne vorherige Zugabe von Galanin oder VIP untersucht. Die Inkubationszeit der beiden Antagonisten betrug jeweils 10 min.

Analog dazu wurde der Einfluß des biogenen Amins Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT, 10^{-6} M) getestet (Inkubationszeit: 10 min).

Durch Zugabe von DEA-NO (Diethylamin-Stickstoffmonoxid-Komplex, 10^{-4} M) wurde der Einfluß von NO als weiterer Transmitter des ENS untersucht. Als Inhibitor der NO-Synthase diente wiederum L-NNA (10^{-4} M): Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde dann L-Arginin (10^{-3} M) als natürliches Substrat der NOS und funktioneller Antagonist von L-NNA zupipetiert, um einen möglichen Effekt zu antagonisieren. Eine mögliche L-Arginin-Wirkung wurde auch ohne vorherige L-NNA-Zugabe untersucht (Inkubationszeit von L-Arginin jeweils 15 min). ODQ (10^{-5} M) wurde wieder als Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase eingesetzt (Inkubationszeit: 15 min).

2.3.2.4 Einfluß von Opioiden auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

Die Stimulationsparameter und das Versuchsprotokoll wurden zur Untersuchung des Einflusses von Opioidrezeptoragonisten und -antagonisten beibehalten. Als spezifische Agonisten der verschiedenen Opioidrezeptor-Typen (δ -, κ -, bzw. μ -Rezeptor) wurden der δ -Agonist SNC 80 (10^{-7} M, 10^{-6} M), der κ -Agonist U-69593 (10^{-7} M, 10^{-6} M) und die beiden endogenen μ -Agonisten Endomorphin-1 und -2 (10^{-6} M) verwendet. Nach Zugabe dieser Substanzen und einer Inkubationszeit von 10 min wurden verschiedene selektive Antagonisten zupipetiert, um einen möglichen spezifischen Effekt der Opioidagonisten aufzuzeigen. Als Substanzen dienten der δ -Antagonist Naltrindol (10^{-6} M), der κ -Antagonist Binaltorphimin (10^{-6} M, 10^{-5} M), der μ -Antagonist CTAP (10^{-6} M) und Naloxon (10^{-6} M), als unspezifischer Antagonist der δ -, κ - und μ -Rezeptoren mit Präferenz des μ -Rezeptors.

Sämtliche Antagonisten wurden auf ihre Wirkung nach ENVS auch ohne Präinkubation der jeweiligen Agonisten überprüft (alle Substanzen 10^{-6} M, Inkubationszeit: 10 min).

Weiterhin wurde der Einfluß von Nociceptin (10^{-8} M, 10^{-7} M) auf die ENVS untersucht, einem endogenen Liganden des ORL₁-Rezeptors (opioid receptor-like), einem eigenständigen Subtyp der Opioidrezeptorfamilie. Nach 10-minütiger Inkubation wurde Naloxon (10^{-6} M) zupipetiert, um einen möglichen Einfluß von Nociceptin an den „klassischen“ Opioidrezeptoren (δ -, κ -, und μ -Rezeptor) zu demaskieren.

2.3.2.5 Einfluß ganglionärer nikotinerger Agonisten auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

In der Absicht, zusätzlich zur vagalen Stimulation auch enterische Neurone zu erregen, wurde die Wirkung selektiver Agonisten ganglionärer nikotinerger Ach-Rezeptoren nach ENVS untersucht. Unter denselben Stimulationsparametern wie bisher wurde der Einfluß von 1,1-Dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP, 10^{-5} M, 10^{-4} M) und Epibatidin (10^{-10} - 10^{-7} M) getestet, einem Alkaloid, das aus der Haut des ecuadorianischen Giffrosches *Epipedobates tricolor* gewonnen wird (Inkubationszeit jeweils 5 min). Weiterhin wurde DMPP (10^{-5} M, 10^{-4} M) und Epibatidin (10^{-8} , 10^{-7} M) auf durch den muskarinergen Agonisten Carbachol (10^{-5} M) präkontrahierte Muskelstreifen zugegeben, um einen direkten Effekt von DMPP bzw. Epibatidin an der glatten Muskulatur nach vagaler Stimulation auszuschließen.

Das Versuchsprotokoll wurde auch nach 15-minütiger Präinkubation von L-NNA (10^{-4} M) wiederholt, um einen möglichen NO-vermittelten Mechanismus der ganglionären Agonisten nachzuweisen. Weiterhin wurde der beobachtete DMPP-Effekt an der quergestreiften Muskulatur auf seine Wiederholbarkeit nach vorheriger Zugabe von Hexamethonium (10^{-4} M) überprüft.

2.4 Verwendete Substanzen

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Tetrodotoxin (TTX), Hexamethonium, Atropin, Tubocurarin, Pancuronium, 1,1-Dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP), 5-Hydroxytryptamin (5-HT), Carbachol, N^ω-Nitro-L-Arginin (L-NNA), L-Arginin (alle SIGMA-CHEMICALS, St.Louis, MO, USA),

Galanin, Galanin 1-15, VIP, VIP 10-28, Endomorphin-1, Endomorphin-2, CTAP (alle BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland),

¹H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ), SNC 80, nor-Binaltorphimin, Naloxon, Naltrindol, (±)-Epibatidin (alle TOCRIS, BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland),

Diethylamin-Stickstoffmonoxid-Komplex (DEA-NO), U-69593 (alle RBI Research Biochemicals Incorporated, Natick, MA, USA).

An den Versuchstagen wurden alle Substanzen frisch in isotoner Kochsalzlösung aufgelöst und weiter mit KRS verdünnt. TTX, L-Arginin und (±)-Epibatidin wurden in verdünnter Salzsäure (0,1N HCl), U-69593 und Naltrindol in Äthanol (10%) und SNC 80 in Dimethylsulfoxidyl (DMSO) gelöst, bevor sie ebenfalls mit KRS weiterverdünnt wurden. Die Endverdünnung aller Substanzen wurde so gewählt, daß durch die Zugabe von 30µl bei der transmuralen Stimulation bzw. 1000 µl bei der vagalen Stimulation die erwünschte Endkonzentration im Organbad erreicht wurde. Um unspezifische Effekte der Lösungsmittel auszuschließen, wurden Kontrollversuche mit den einzelnen Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei konnte kein signifikanter Effekt nach Zugabe von HCl, Äthanol oder DMSO in der jeweils verwendeten Endkonzentration beobachtet werden.

2.5 Datenauswertung und Statistik

Zur Datenauswertung wurden die Kontraktionskurven vor (=Kontrolle) und nach Substanzzugabe verglichen. Bei der TES wurde die Kontrolle (=100 %) durch die Bildung des Mittelwertes der Kontraktionsamplituden von 5 Stimuli vor Substanzzugabe ermittelt. Inhibitorische oder exzitatorische Effekte durch die Substanzen wurden durch den Mittelwert von 5 Stimuli nach der entsprechenden Inkubationszeit der Substanzen bestimmt und im Vergleich zur Kontrolle als Änderung der Kontraktionsamplitude in % ausgedrückt.

Analog dazu wurden bei der ENVS die Mittelwerte von 3 Stimulationszyklen vor und nach Substanzzugabe verglichen. Da die ENVS in einer biphasischen Kontraktionsantwort resultierte, wurden pro Stimulation zwei Werte ermittelt: Ein Wert für die maximale Amplitude der initialen schnellen Komponente und ein zweiter Wert für die maximale Plateauhöhe der Kontraktion nach Beendigung des elektrischen Reizes (Abb.2).

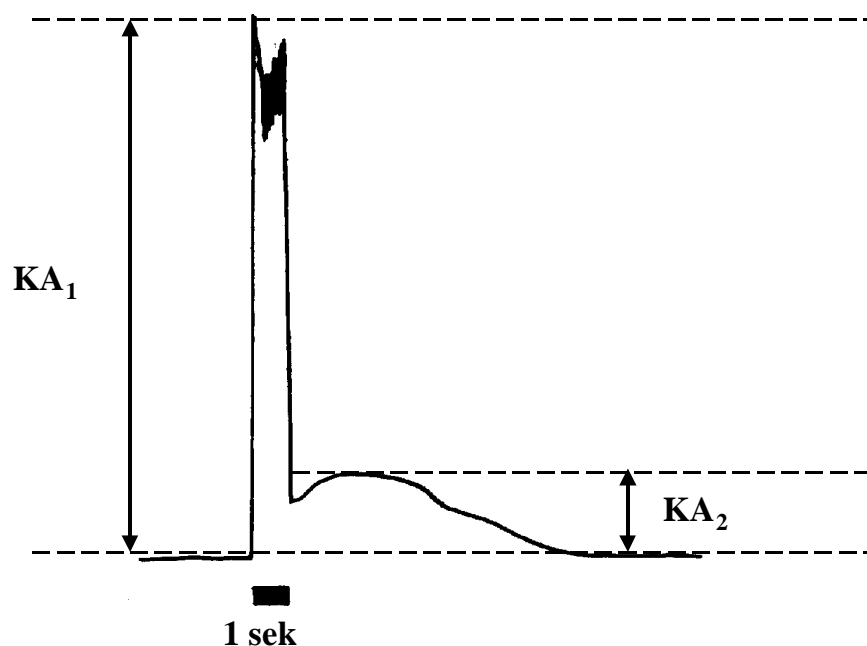


Abbildung 2: Typische Kontraktionsantwort nach Nervus vagus-Stimulation (40 V, 0,5 ms, 20 Hz, 1000 ms). Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die für die Auswertung relevanten Messwerte: KA_1 = Maximale Kontraktionsamplitude der initialen schnellen Komponente und KA_2 = Maximale Kontraktionsamplitude nach Beendigung des elektrischen Reizes. Der horizontale Balken kennzeichnet den elektrischen Stimulus von 1000 ms Dauer.

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. (Standardfehler) angegeben; n (=number) steht für die Anzahl unabhängiger Ergebnisse an verschiedenen Ösophagussegmenten bei der TES bzw. an verschiedenen Ösophagi von unterschiedlichen Tieren bei der ENVS. Die Mittelwerte wurden mit dem Student-t-Test für gepaarte Stichproben und der Varianzanalyse verglichen. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der Signifikanzfaktor p kleiner als 0,05 war ($p < 0,05$). Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet ($\star = p < 0,05$; $\star\star = p < 0,01$; $\star\star\star = p < 0,001$).

3. Ergebnisse

3.1. Transmurale elektrische Stimulation

In den ersten Minuten der 30-minütigen Inkubationszeit des Gewebes fiel die passiv angelegte Vorspannung der Muskelstreifen von 1 g um ca. 20 % ab, wonach der Basaltonus der Muskulatur konstant blieb. Die nur unregelmäßig beobachtete Spontanaktivität nahm während der Äquilibrationszeit kontinuierlich ab und war im Vergleich zum Kontraktionsniveau nach TES verschwindend gering. Wie im Methodikteil beschrieben, wurden alle Experimente mit TES mit denselben Stimulationsparametern durchgeführt (20 V, 0,2 ms, 0,1 Hz), d.h. alle 10 s wurde ein elektrischer Einzelimpuls appliziert, der in einer ruckartigen, eingipfligen Kontraktionsantwort resultierte (Abb.3), die über einen Zeitraum von mindestens 2 h stabil reproduzierbar war.

3.1.1 Einfluß von TTX, Atropin, Tubocurarin und Pancuronium auf die Kontraktionsantwort nach TES

Die Zugabe von Atropin (10^{-6} M) zeigte keinen Einfluß auf die durch TES induzierte Kontraktionsantwort ($-0,6 \pm 1,5$ %, $n=6$) (Abb.3a), so daß davon ausgegangen werden muß, daß die beobachteten Kontraktionen ausschließlich der quergestreiften Muskulatur zuzuordnen sind. Die beiden nikotinergen Blocker der neuromuskulären Übertragung an der motorischen Endplatte Tubocurarin (10^{-5} M) und Pancuronium (10^{-5} M) bewirkten eine signifikante Inhibition der durch TES ausgelösten Kontraktionen um nur $23,1 \pm 1,9$ % ($n=4$, $p<0,01$) bzw. $34,1 \pm 2,3$ % ($n=13$, $p<0,001$) (Abb.3a, Abb.4), was darauf hindeutet, daß trotz niedrig gewählter Stimulationsparameter ein Großteil der Kontraktion durch eine direkte Stimulation der quergestreiften Muskulatur ausgelöst wird. Nach Inkubation mit TTX (10^{-6} M) konnte man allerdings eine komplette Hemmung der Kontraktion der quergestreiften Muskulatur beobachten ($-99,9 \pm 0,2$ %, $n=7$, $p<0,001$) (Abb.3b, Abb.4).

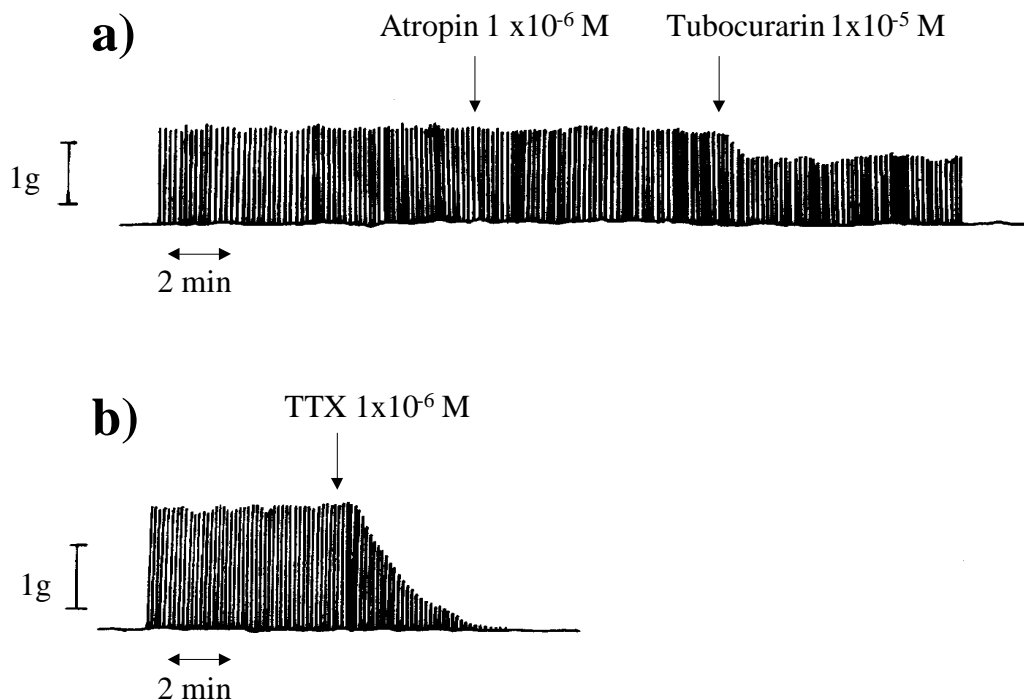


Abbildung 3: a, Einfluß von Atropin (10^{-6} M), Tubocurarin (10^{-5} M) und b, TTX (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort eines Ösophagusmuskelstreifens nach TES (20 V, 0,2 ms, 0,1 Hz) (Originalaufzeichnungen zweier Präparationen).

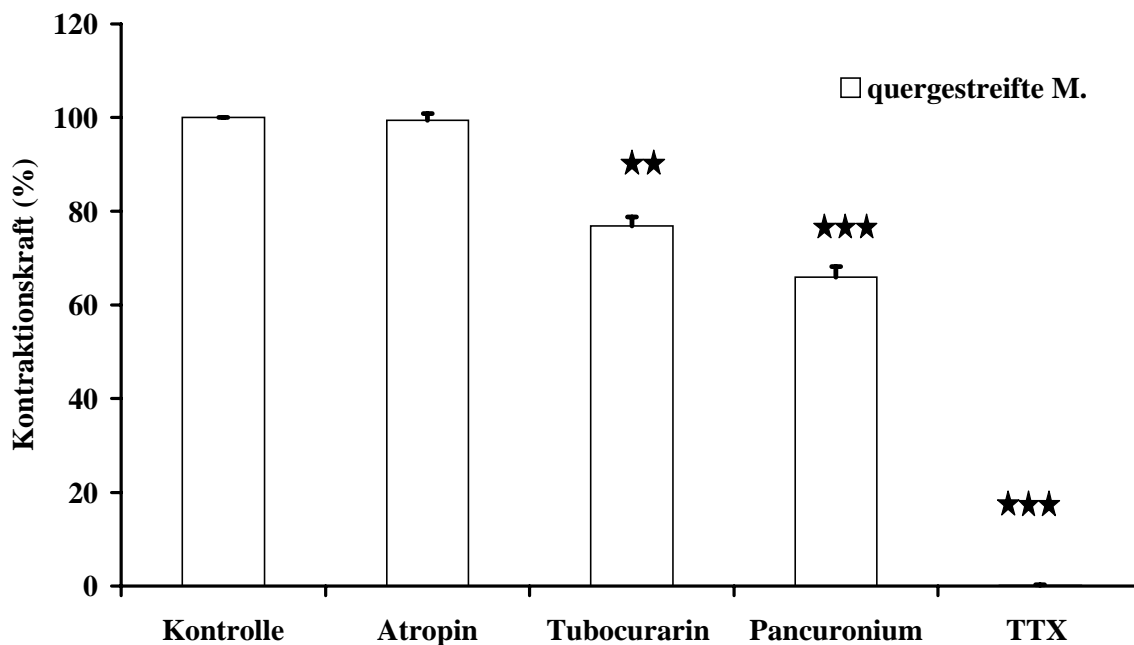


Abbildung 4: Einfluß von Atropin (10^{-6} M), Tubocurarin (10^{-5} M), Pancuronium (10^{-5} M) und TTX (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort nach TES (20 V, 0,2 ms, 0,1 Hz). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star\star = p < 0,01$; $\star\star\star = p < 0,001$.

3.1.2 Einfluß von L-NNA, L-Arginin und ODQ auf die Kontraktionsantwort nach TES

Eine 15-minütige Inkubation weder mit dem Inhibitor der NO-Synthase L-NNA (10^{-4} M) noch mit dem selektiven Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase ODQ (10^{-5} M) konnte eine signifikante Änderung der Kontraktionsamplitude der Muskelstreifen nach elektrischer Feldstimulation nachweisen (L-NNA: $+4,3 \pm 1,8$ %, $n=4$; ODQ: $-2,8 \pm 1,8$ %, $n=10$). Die nicht signifikante Kontraktionszunahme nach L-NNA-Zugabe war auch nach anschließender Zugabe von L-Arginin (10^{-3} M) als Substrat der NOS nur teilweise und nicht signifikant reversibel (L-NNA + L-Arginin: $+3,5 \pm 1,3$ %, $n=4$). Ebenso wenig ließ sich ein signifikanter Effekt nach alleiniger Zugabe von L-Arginin beobachten ($-1,0 \pm 1,3$ %, $n=5$) (Abb.5).

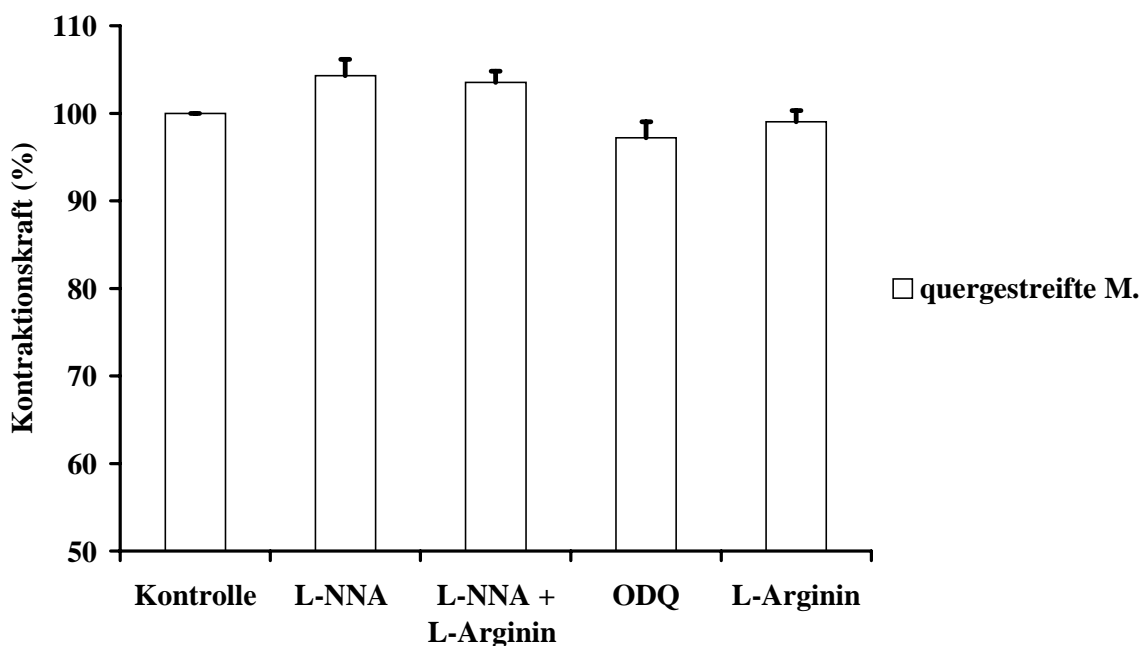


Abbildung 5: Einfluß von L-NNA (10^{-4} M), L-NNA (10^{-4} M) + L-Arginin (10^{-3} M), ODQ (10^{-5} M) und L-Arginin (10^{-3} M) alleine auf die Kontraktionsantwort nach TES (20 V, 0,2 ms, 0,1 Hz). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Änderungen der Kontraktionsamplituden erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Substanz	% Kontraktionsänderung	n
Atropin (10^{-6} M)	$-0,6 \pm 1,5$ %	n=6, n.s.
Tubocurarin (10^{-5} M)	$-23,1 \pm 1,9$ %	n=4, ★★
Pancuronium (10^{-5} M)	$-34,1 \pm 2,3$ %	n=13, ★★★
TTX (10^{-6} M)	$-99,9 \pm 0,2$ %	n=7, ★★★
L-NNA (10^{-4} M)	$+4,3 \pm 1,8$ %	n=4, n.s.
L-NNA (10^{-4} M) + L-Arginin (10^{-3} M)	$+3,5 \pm 1,3$ %	n=4, n.s.
ODQ (10^{-5} M)	$-2,8 \pm 1,8$ %	n=10, n.s.
L-Arginin (10^{-3} M)	$-1,0 \pm 1,3$ %	n=5, n.s.

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die Einflüsse der verwendeten Substanzen auf die Kontraktionsantwort isolierter Muskelstreifen des Rattenösophagus nach TES, ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★★= $p < 0,01$; ★★★= $p < 0,001$; n.s.= nicht signifikant.

3.2. Elektrische Nervus vagus-Stimulation

Die Experimente nach TES haben gezeigt, daß die beobachtete Kontraktionsantwort zum überwiegenden Teil nicht neuronal vermittelt ist, sondern einer direkten Stimulation der quergestreiften Muskulatur unterliegt, was eine Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf eine neuronal vermittelte Modulation der Kontraktionsantwort durch das ENS besonders erschwert. Um diese direkte Stimulation der Muskulatur auszuschließen, wurde der unter 2.2.2 beschriebene Versuchsaufbau gewählt, in dem der Nervus vagus mindestens 1,5 cm vom Ösophagus entfernt stimuliert wurde, was nach repetitiver Reizung des Nerven nun auch zusätzlich eine Beurteilung der glatten Muskulatur zuließ.

Zu Beginn der Inkubationszeit des Ösophagus kam es zu einem Abfall der angelegten Vorspannung von 1 g um ca. 40-50 % und blieb danach konstant. Spontanaktivität war äußerst gering und nur in den ersten Minuten der Äquilibrationszeit zu beobachten. Mit Ausnahme der Versuche unter 3.2.1, in denen die Frequenz variiert wurde, wurden alle Versuche nach ENVs mit denselben Stimulationsparametern durchgeführt.

3.2.1 Charakterisierung der Kontraktionsantwort nach ENVS mittels verschiedener Stimulationsparameter

Die vagale Stimulation resultierte in einer biphasischen Kontraktionsantwort, die in Abhängigkeit von der applizierten Stimulationsfrequenz (1-50 Hz bei 40 V, 0,5 ms, 1000 ms) unterschiedliche Kontraktionseigenschaften aufwies. Der erste Teil dieser biphasischen Kontraktion entstand unmittelbar mit der Applikation des elektrischen Reizes und sistierte sofort nach Beendigung des Reizes, wobei die Kontraktionsantwort in den niedrigen Frequenzbereichen von 1-10 Hz aus eingipfligen „twitch“-Kontraktionen bestand und erst nach hochfrequenter Reizung (20-50 Hz) eine tetanische Form annahm. Während die Kontraktionsamplitude in den niederen Frequenzen bis 10 Hz nahezu unverändert blieb, so zeigte sich in den höheren Frequenzen ab 20 Hz mit Einsetzen des Tetanus eine frequenzabhängige, stetige Zunahme der Amplitude (Abb.6, Abb.7).

Der zweite Teil der biphasischen Kontraktionskurve entstand im Gegensatz zum ersten Teil ca. 0,8-1,2 s nach Applikation des elektrischen Reizes, war von phasischer Qualität und dauerte je nach Stimulationsfrequenz 1-8 s. Die maximale Plateauhöhe wurde 2-4 s nach Stimulationsbeginn erreicht und betrug zwischen 10 und 20 % der Amplitude der ersten Antwort. Diese zweite Kontraktionsantwort war verlässlich ab einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz zu beobachten, in geringem Maße meist schon nach 1 Hz. Die Kontraktionsamplitude nahm frequenzabhängig bis 20 Hz stetig zu, während ab 20 Hz keine wesentliche Kontraktionszunahme mehr erkennbar war und bei 50 Hz wieder leicht abfiel (Abb.6, Abb.7). Ab 10 Hz kam es zu einer partiellen Überschneidung der zu differenzierenden Kontraktionsantworten, was aber die quantitative Auswertung nicht beeinträchtigte. Gelegentlich abweichende Fallzahlen zwischen erster und zweiter Kontraktionsantwort in den Experimenten mit Substanzen sind dadurch zu erklären, daß in einigen Versuchsdurchläufen keine zweite glattmuskuläre Kontraktionsantwort beobachtet wurde (in 11 von insgesamt 152 Versuchen nach ENVS; =7,2 %), was z.B. durch eine Schädigung vagaler Fasern bei der Präparation verursacht sein könnte.

Nach einer durchgeführten Vagotomie konnten keinerlei Muskelkontraktionen nach ENVS bei Frequenzen bis 50 Hz mehr registriert werden (n=2), was eine direkte Stimulation der Muskulatur auch im hohen Frequenzbereich ausschließt.

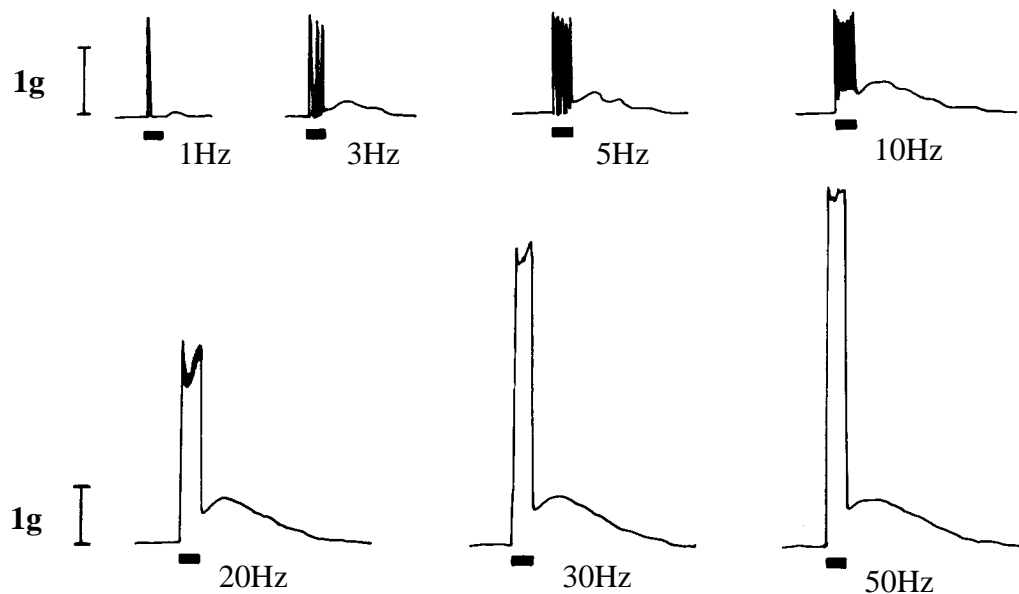


Abbildung 6: Originalaufzeichnung der biphasischen Kontraktionsantwort nach ENVS in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz (1-50 Hz). Standardstimulationsparameter: 40 V, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer.

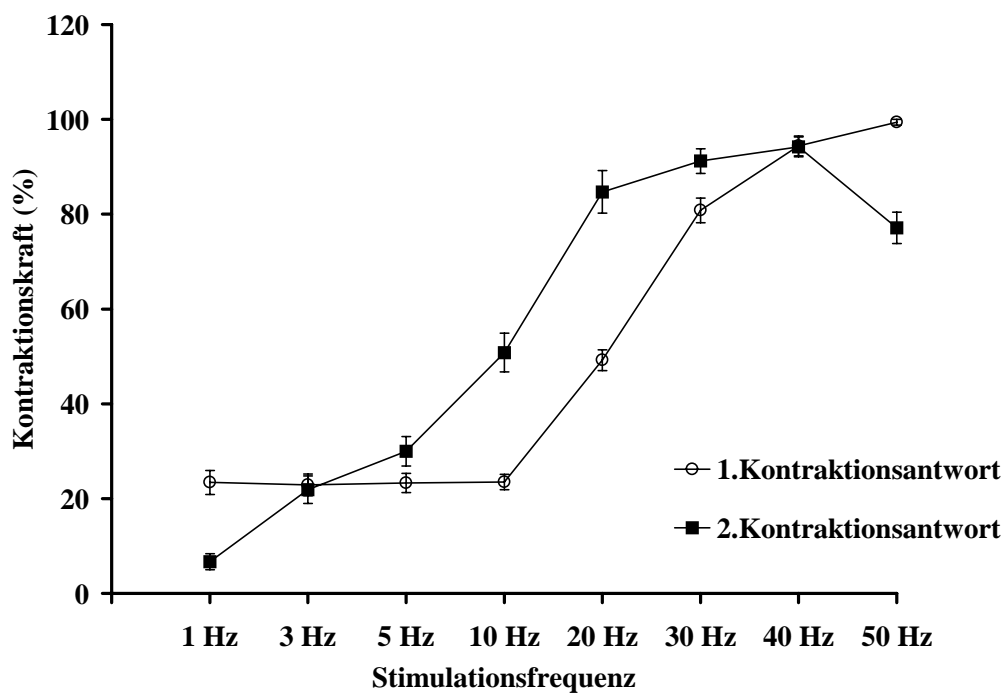


Abbildung 7: Frequenz-Kontraktionskurven der beiden Kontraktionsantworten nach ENVS unter Standardstimulationsparameter (40 V, 0,5 ms, 1 s). 100% Kontraktionskraft = maximale Kontraktionsamplitude der jeweiligen Kontraktionsantwort beobachtet bei 1-50 Hz. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt (n=13).

Stimulationsfrequenz	1.Kontraktionsantwort in % des Maximums	2.Kontraktionsantwort in % des Maximums
1 Hz	23,4 ± 2,5 %	6,7 ± 1,7 %
3 Hz	22,9 ± 2,3 %	21,9 ± 2,9 %
5 Hz	23,3 ± 2,0 %	30,0 ± 3,1 %
10 Hz	23,5 ± 1,6 %	50,8 ± 4,1 %
20 Hz	49,2 ± 2,2 %	84,7 ± 4,5 %
30 Hz	80,8 ± 2,5 %	91,2 ± 2,6 %
40 Hz	94,4 ± 2,1 %	94,2 ± 2,1 %
50 Hz	99,4 ± 0,6 %	77,1 ± 3,3 %
50 Hz + Vagotomie	0,0 ± 0,0 %	0,0 ± 0,0 %

Tabelle 2: Einfluß der Stimulationsfrequenz (n=13) und anschließender Vagotomie (n=2) auf die durch ENVS induzierte biphasische Kontraktionsantwort bei 40 V, 0,5 ms und 1 s Stimulationsdauer. 100% Kontraktionskraft = maximale Kontraktionsamplitude der jeweiligen Kontraktionsantwort beobachtet bei 1-50 Hz. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt.

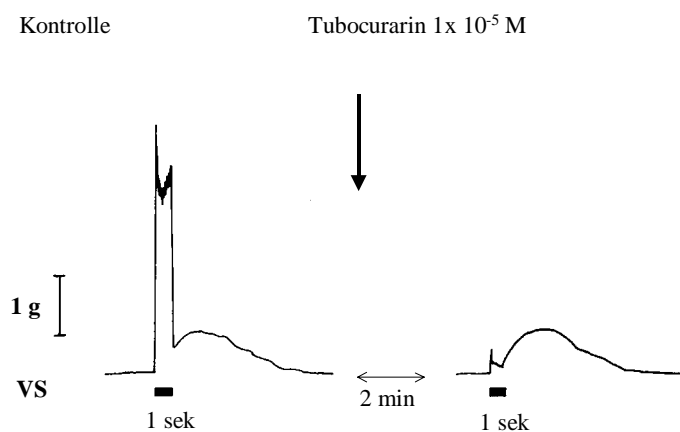
3.2.2 Einfluß von Atropin, Hexamethonium, Tubocurarin und TTX auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

Um die beiden Komponenten der beobachteten biphasischen Kontraktionsantwort und die Art der Neurotransmission nach vagaler Stimulation näher zu charakterisieren, wurden Versuche mit Atropin, Hexamethonium, Tubocurarin und TTX durchgeführt. Die Zugabe von Tubocurarin (10^{-5} M) verursachte dabei eine komplette Hemmung der initialen tetanischen Kontraktionsantwort ($-98,3 \pm 0,7$ %, n=5, $p < 0,001$), wobei die zweite Kontraktionsantwort unbeeinflusst blieb ($-1,6 \pm 3,2$ %, n=5) (Abb.8a, Abb.9). Atropin (10^{-6} M) dagegen zeigte keine signifikante Wirkung auf die erste Kontraktionsantwort ($-2,5 \pm 1,5$ %, n=4), inhibierte aber die 2. Komponente der Kontraktionskurve um $97,7 \pm 1,5$ % (n=4, $p < 0,01$) (Abb.8b, Abb.9). Ebenso blieb die Kontraktionsamplitude der ersten Antwort nach Inkubation mit Hexamethonium (10^{-4} M) unverändert ($-1,0 \pm 1,5$ %, n=5), während die Amplitude der zweiten Kontraktionsantwort um $83,1 \pm 4,8$ % abnahm (n=5, $p < 0,01$) (Abb.8c, Abb.9). Die

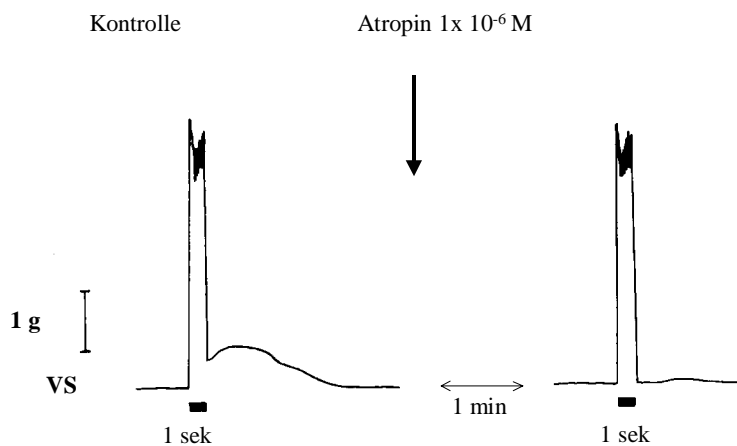
Zugabe von TTX (10^{-6} M) bewirkte eine vollständige Inhibition beider Antworten (1. KA: $-100,0 \pm 0,0$ %; 2. KA: $-100,0 \pm 0,0$ %, $n=2$, $p<0,05$) (Abb.8d, Abb.9).

Die beobachtete selektive Hemmung der initialen, schnellen Antwort durch den nikotinergen Blocker der Neurotransmission an der motorischen Endplatte Tubocurarin bzw. der langsamen, zweiten Komponente durch den muskarinergen Antagonisten Atropin und des Ganglienblockers Hexamethonium zeigt, daß es sich im Falle der ersten Antwort um eine Kontraktion der quergestreiften Muskulatur handelt und die zweite Antwort durch Erregung glatter Muskulatur entsteht. Im Folgenden werden erste bzw. zweite Kontraktionsantwort auch als Kontraktionsantwort der quergestreiften bzw. der glatten Muskulatur bezeichnet.

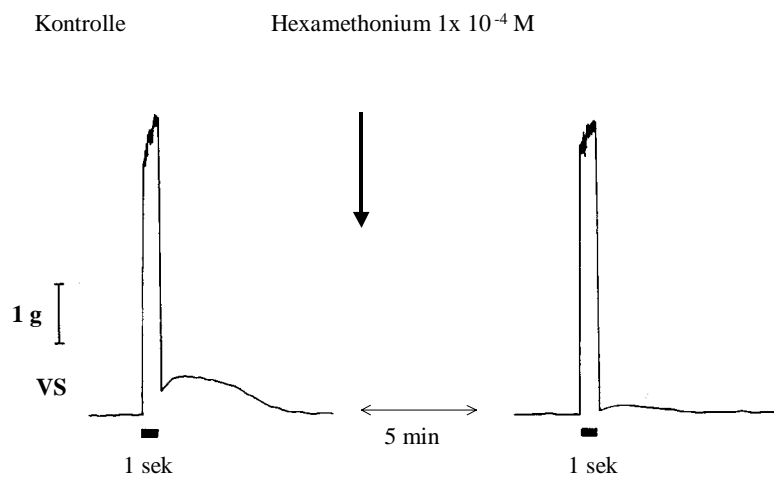
a)



b)



c)



d)

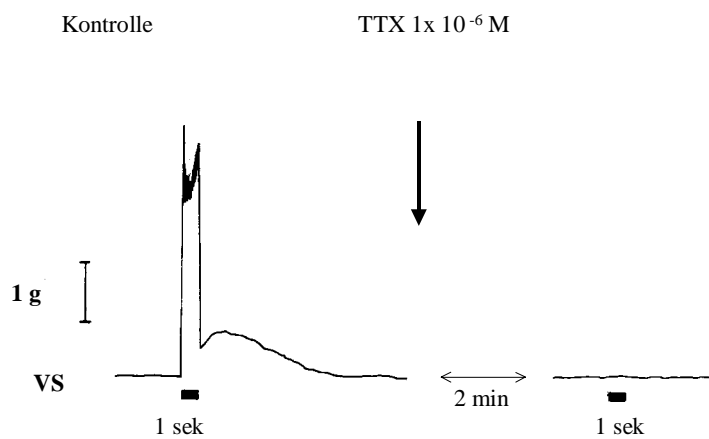


Abbildung 8: Originalaufzeichnungen der Kontraktionsantworten nach vagaler Stimulation vor und nach Zugabe von a) Tubocurarin (10^{-5} M), b) Atropin (10^{-6} M), c) Hexamethonium (10^{-4} M) und d) Tetrodotoxin (10^{-6} M). Standardstimulationsparameter: 40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer. VS: Vagale Stimulation.

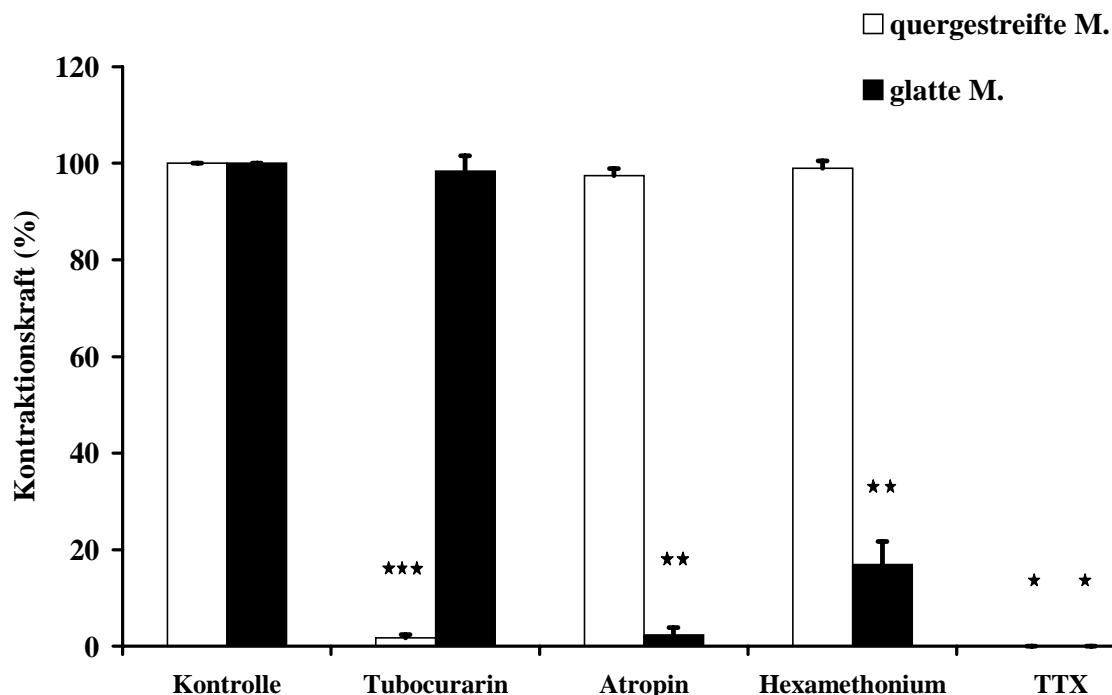


Abbildung 9: Einfluß von Tubocurarin (10^{-5} M), Atropin (10^{-6} M), Hexamethonium (10^{-4} M) und Tetrodotoxin (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. \star = $p<0,05$; $\star\star$ = $p<0,01$; $\star\star\star$ = $p<0,001$.

3.2.3 Einfluß verschiedener Transmitter des enterischen Nervensystems auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

3.2.3.1 Einfluß von Galanin, VIP und Serotonin

Die Zugabe des 29-Aminosäuren-Peptids Galanin (10^{-8} M, 10^{-7} M) bewirkte keine signifikante Änderung des Kontraktionsniveaus der quergestreiften Muskulatur, woran auch die anschließende Inkubation mit dem Galaninrezeptorantagonisten Galanin 1-15 (2×10^{-7} M) nichts änderte (Galanin 10^{-8} M: $-1,1 \pm 1,8$ %; Galanin 10^{-7} M: $-3,9 \pm 1,8$ %; Galanin 10^{-7} M + Galanin 1-15 2×10^{-7} M: $-2,0 \pm 2,4$ %, $n=7$). Bei der glatten Muskulatur konnte man dagegen einen deutlichen Rückgang der Kontraktionsamplitude beobachten, wobei dieser Effekt nach Zugabe des Antagonisten signifikant reversibel war (Galanin 10^{-8} M: $-18,5 \pm 2,2$ %, $p<0,01$; 10^{-7} M: $-40,4 \pm 2,9$ %, $p<0,001$; Galanin 10^{-7} M + Galanin 1-15 2×10^{-7} M: $-18,0 \pm 4,0$ %, $p<0,05$, $n=7$) (Abb.10). Nach alleiniger Inkubation von Galanin 1-15 (10^{-7} M) konnte

allerdings keine signifikante Wirkung weder auf die quergestreifte ($+5,1 \pm 3,0 \%$) noch auf die glatte Muskulatur demonstriert werden ($+2,6 \pm 5,7 \%$, $n=5$) (Tab.3).

Das 28-Aminosäuren-Peptid VIP (10^{-7} M) bewirkte nur einen tendenziellen, nicht signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Kontraktionskraft der quergestreiften Muskulatur, der nach Zugabe des VIP-Antagonisten VIP 10-28 (5×10^{-7} M) auch nicht signifikant reversibel war (VIP 10^{-7} M: $-5,9 \pm 1,2 \%$; VIP 10^{-7} M + VIP 10-28 5×10^{-7} M: $-4,3 \pm 2,1 \%$, $n=8$). Auf die glatte Muskulatur zeigte die Inkubation mit VIP eine deutliche hemmende Wirkung, die durch die anschließende Zugabe von VIP 10-28 signifikant reversibel war (VIP 10^{-7} M: $-53,8 \pm 4,2 \%$, $p<0,001$; VIP 10^{-7} M + VIP 10-28 5×10^{-7} M: $-21,9 \pm 7,5 \%$, $p<0,001$, $n=8$) (Abb.11). Die alleinige Zugabe von VIP 10-28 (10^{-7} M) hatte keinen Einfluß auf quergestreifte ($+0,4 \pm 0,4 \%$) oder glatte Muskulatur ($-1,5 \pm 3,4 \%$, $n=3$) (Tab.3).

Auch nach Zugabe des biogenen Amins Serotonin (10^{-6} M) konnte man eine signifikante Inhibition der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur beobachten ($-78,2 \pm 2,1 \%$, $p<0,05 \%$, $n=4$), wohingegen die Kontraktionsantwort der quergestreiften Muskulatur unbeeinflusst blieb ($-0,3 \pm 1,4 \%$, $n=4$) (Abb.12).

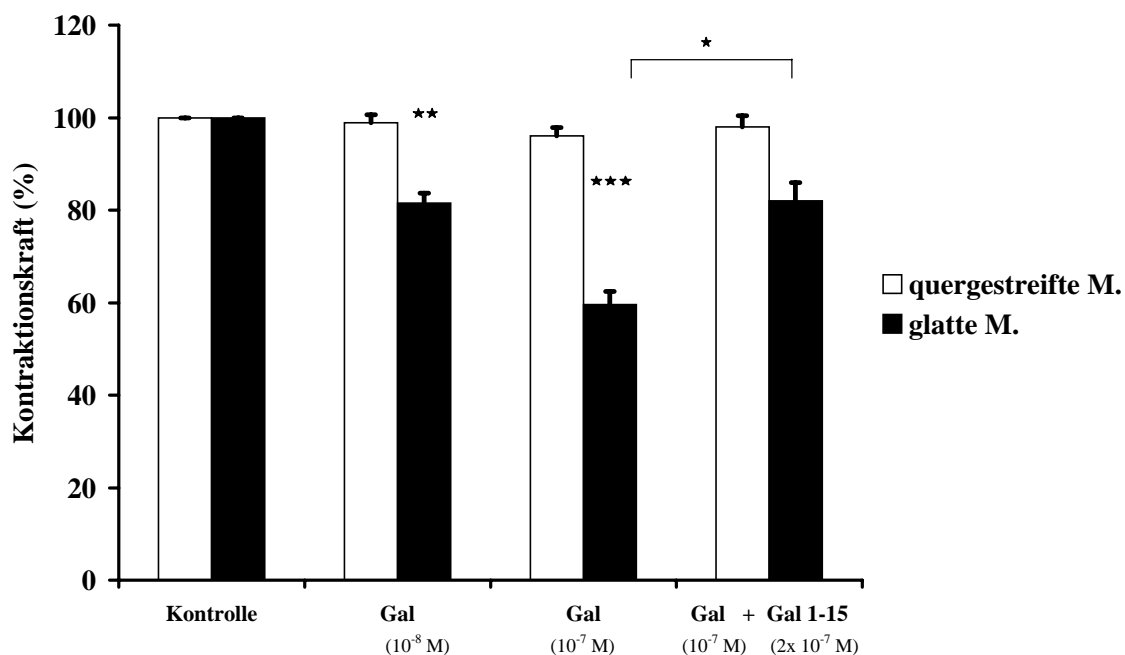


Abbildung 10: Einfluß von Galanin (10^{-8} M, 10^{-7} M) und anschließender, zusätzlicher Inkubation mit dem Galaninantagonisten Galanin 1-15 (2×10^{-7} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENV5 (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star = p<0,05$; $\star\star = p<0,01$; $\star\star\star = p<0,001$.

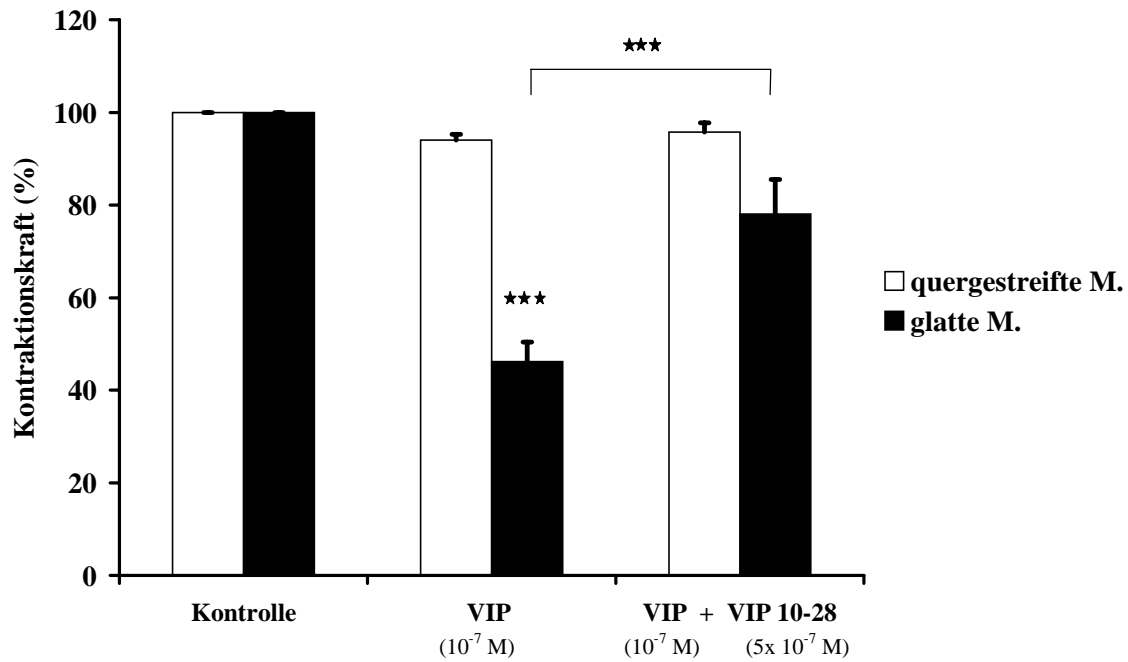


Abbildung 11: Einfluß von VIP (10^{-7} M) und anschließender, zusätzlicher Inkubation mit dem VIP-Antagonisten VIP 10-28 (5×10^{-7} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $*** = p < 0,001$.

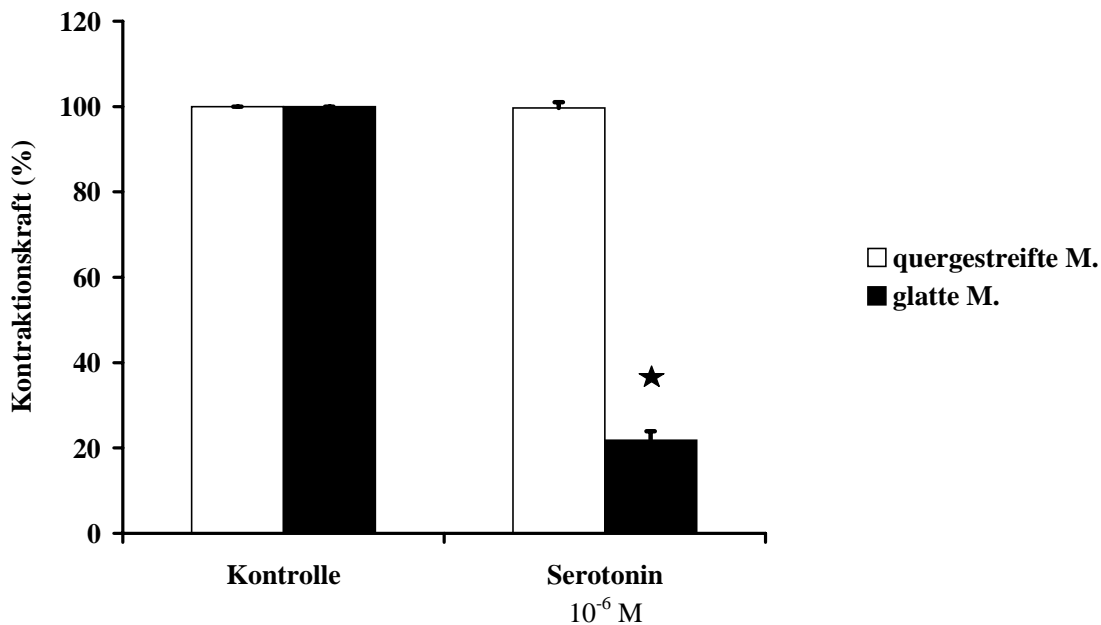


Abbildung 12: Einfluß von Serotonin (5-HT, 10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star = p < 0,05$.

Substanz	quergestreifte M.	glatte M.	n
Galanin (10^{-8} M)	-1,1 ± 1,8 %, n.s.	-18,5 ± 2,2 %, ★★★	n=7
Galanin (10^{-7} M)	-3,9 ± 1,8 %, n.s.	-40,4 ± 2,9 %, ★★★	
Galanin (10^{-7} M) + Galanin 1-15 (2×10^{-7} M)	-2,0 ± 2,4 %, n.s.	-18,0 ± 4,0 %, #	
Galanin 1-15 (2×10^{-7} M)	+5,1 ± 3,0 %, n.s.	+2,6 ± 5,7 %, n.s.	n=5
VIP (10^{-7} M)	-5,9 ± 1,2 %, n.s.	-53,9 ± 4,2 %, ★★★	n=8
VIP (10^{-7} M) +VIP 10-28 (5×10^{-7} M)	-4,3 ± 2,1 %, n.s.	-21,9 ± 7,5 %, # # #	
VIP 10-28 (5×10^{-7} M)	+0,4 ± 0,4 %, n.s.	-1,5 ± 3,4 %, n.s.	
Serotonin (10^{-6} M)	-0,3 ± 1,4 %, n.s.	-78,2 ± 2,1 %, ★	n=4

Tabelle 3: Einfluß von Galanin, Galanin 1-15, VIP, VIP 10-28 und Serotonin auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENV5 (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. ★=p<0,05; ★★= p<0,01; ★★★= p<0,001; #=p<0,05; ###=p<0,001 (Agonist +Antagonist vs. Agonist); n.s.= nicht signifikant.

3.2.3.2 Einfluß von L-NNA, L-Arginin, ODQ und DEA-NO

Um die Wirkung von NO (Stickstoffmonoxid), als weiteren Transmitter des ENS auf die extrinsische Innervation des Rattenösophagus zu untersuchen, wurde NO exogen in Form eines Diethylamin-Stickstoffmonoxid-Komplexes (DEA-NO, 10^{-4} M) zugegeben. Dabei kam es zu einer ausgeprägten Inhibition der Kontraktionsantwort der glatten Muskulatur ($-81,6 \pm 7,4$ %, p<0,05, n=4). Die Kontraktionsamplitude der quergestreiften Muskulatur blieb durch die exogene NO-Zugabe unbeeinträchtigt ($-1,6 \pm 2,7$ %, n=4) (Abb.13).

Durch eine 15-minütige Inkubation mit L-NNA (10^{-4} M) kam es zu einer geringen Kontraktionszunahme beider Muskeltypen, die sich allerdings statistisch als nicht signifikant erwies (quergestreifte M.: $+7,9 \pm 4,6$ %, n=10; glatte M.: $+11,2 \pm 6,3$ %, n=8). Diese tendenzielle Kontraktionszunahme beider Muskeltypen war durch eine anschließend erfolgte Inkubation mit L-Arginin (10^{-3} M) jeweils auch nicht signifikant antagonisierbar (L-NNA 10^{-4} M + L-Arginin 10^{-3} M: quergestreifte M.: $+4,0 \pm 3,9$ %, n=10; glatte M.: $+5,0 \pm 6,4$ %, n=8)

(Abb.13). Die alleinige Zugabe von L-Arginin (10^{-3} M) resultierte in keiner Kontraktionsänderung weder der quergestreiften, noch der glatten Muskulatur (quergestreifte M.: $-2,3 \pm 1,5$ %, $n=4$; glatte M.: $+0,9 \pm 2,1$ %, $n=4$) (Abb.14).

Eine 15-minütige Inkubation mit ODQ (10^{-5} M) konnte ebensowenig einen signifikanten Effekt auf die Kontraktionsantwort der beiden Muskeltypen nach vagaler Stimulation nachweisen (quergestreifte M.: $+1,6 \pm 2,6$ %, $n=6$; glatte M.: $-1,6 \pm 1,8$ %, $n=5$) (Abb.14).

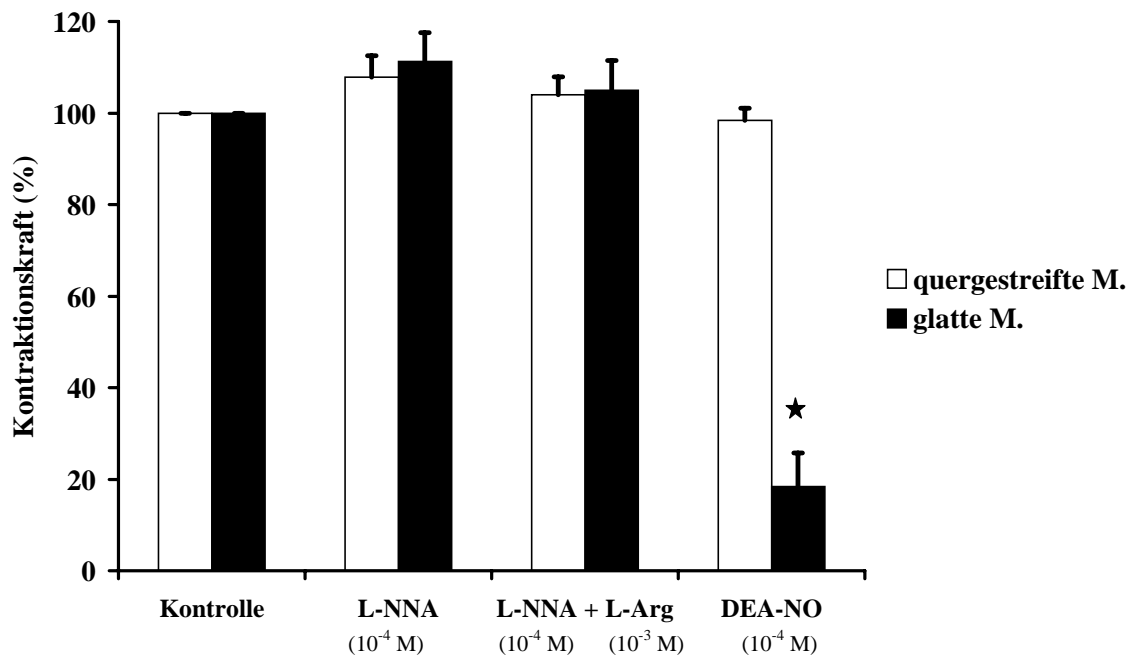


Abbildung 13: Einfluß von L-NNA (10^{-4} M) und anschließender, zusätzlicher Inkubation mit L-Arginin (10^{-3} M) bzw. Einfluß von exogenem NO (DEA-NO, 10^{-4} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENV5 (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star=p<0,05$.

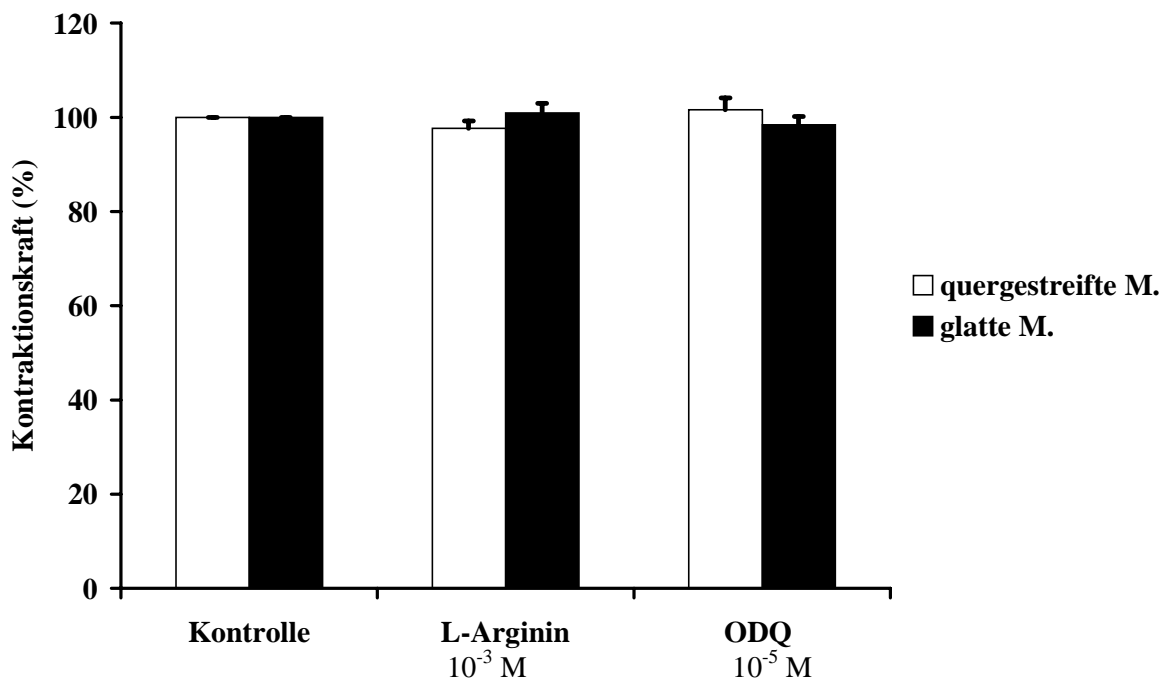


Abbildung 14: Einfluß von L-Arginin (10^{-3} M) alleine und ODQ (10^{-5} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVs (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Änderungen der Kontraktionsamplituden erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Substanz	quergestreifte M.	glatte M.	n
L-NNA (10^{-4} M)	+7,9 \pm 4,6 %, n.s.	+11,2 \pm 6,3 %, n.s.	n=10, bzw. n=8
L-NNA (10^{-4} M) + L-Arginin (10^{-3} M)	+4,0 \pm 3,9 %, n.s.	+5,0 \pm 6,4 %, n.s.	
DEA-NO (10^{-4} M)	-1,6 \pm 2,7 %, n.s.	-81,6 \pm 7,4 %, ★	n=4
ODQ (10^{-5} M)	+1,6 \pm 2,6 %, n.s.	-1,6 \pm 1,8 %, n.s.	n=6 bzw. n=5
L-Arginin (10^{-3} M)	-2,3 \pm 1,5 %, n.s.	+0,9 \pm 2,1 %, n.s.	n=4

Tabelle 4: Einfluß von L-NNA (10^{-4} M), L-NNA (10^{-4} M) + L-Arginin (10^{-3} M), DEA-NO (10^{-3} M), ODQ (10^{-5} M) und L-Arginin (10^{-3} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVs (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★= $p < 0,05$.

3.2.3.3 Einfluß von Opioiden auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

Um einen möglichen Einfluß von Opioiden auf die Kontraktionsantwort des Rattenösophagus nach ENVS zu untersuchen, wurden Agonisten der verschiedenen Opioidrezeptoren (δ -, κ -, μ - und ORL₁- Rezeptor) angewendet. Der δ -Agonist SNC 80 (10^{-7} M, 10^{-6} M) führte dabei zu keiner signifikanten Änderung der Kontraktionsamplitude der beiden Muskeltypen (quergestreifte M.: 10^{-7} M: $-3,3 \pm 3,7$ %, 10^{-6} M: $+1,0 \pm 1,4$ %, n=2; glatte M.: 10^{-7} M: $-3,1 \pm 0,6$ %, 10^{-6} M: $-2,3 \pm 0,4$ %, n=2) (Tab.5), weshalb anschließend der δ -Antagonist Naltrindol nicht zugegeben wurde, sondern lediglich in einer eigenen Versuchsreihe auf seine Wirksamkeit ohne vorherige Inkubation mit dem Agonisten getestet wurde. Auch hier blieb ein Effekt auf die Muskulatur nach Zugabe von Naltrindol (10^{-6} M) aus (quergestreifte M.: $-0,8 \pm 3,3$ %, n=3; glatte M.: $-0,3 \pm 1,7$ %, n=3) (Tab.6).

Als Agonist am κ -Rezeptor diente U-69593 (10^{-7} M, 10^{-6} M), der keinen signifikanten Einfluß auf die Stimulationsantwort der quergestreiften Muskulatur hatte (10^{-7} M: $-4,2 \pm 2,8$ %, 10^{-6} M: $-4,6 \pm 3,7$ %, n=3). Dagegen bewirkte der κ -Agonist eine konzentrationsabhängige Inhibition der glatten Muskulatur, die allerdings nach Inkubation mit dem spezifischen κ -Antagonisten Binaltorphimin in einer Konzentration bis zu 10^{-5} M nicht reversibel war (U-69593 10^{-7} M: $-18,9 \pm 1,7$ %, $p < 0,05$, U-69593 10^{-6} M: $-38,9 \pm 3,8$ %, $p < 0,05$, U-69593 10^{-6} M + Binaltorphimin 10^{-5} M: $-39,8 \pm 3,9$ %, n=3) (Abb.15). Auch die zusätzliche Zugabe des unspezifischen Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (10^{-6} M) konnte die beobachtete Inhibition der glatten Muskulatur nicht wieder aufheben. Die alleinige Inkubation mit Binaltorphimin (10^{-6} M) konnte keinen Einfluß auf die Kontraktionsantworten der beiden Muskeltypen demonstrieren (quergestreifte M.: $-0,2 \pm 1,1$ %, n=3; glatte M.: $-2,3 \pm 1,2$ %, n=3) (Tab.6).

Um eine funktionelle Rolle des μ -Rezeptors an der Regulation der Motilität des Ösophagus zu prüfen, wurde die Wirkung der beiden aus jeweils nur 4 Aminosäuren bestehenden endogenen Opioiden Endomorphin-1 und -2 getestet. Diese beiden Opioiden besitzen eine außerordentlich hohe Affinität und Selektivität am μ -Rezeptor. Die Inkubation mit Endomorphin-1 und Endomorphin-2 (jeweils 10^{-6} M) führte zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktionsamplitude sowohl der quergestreiften (Endomorphin-1: $-13,6 \pm 2,6$ %, $p < 0,01$, n=6; Endomorphin-2 : $-25,1 \pm 5,3$ %, $p < 0,001$, n=16) als auch der glatten Muskulatur (Endomorphin-1: $-49,9 \pm 10,8$ %, $p < 0,01$, n=6; Endomorphin-2 : $-81,1 \pm 3,3$ %, $p < 0,001$,

n=11). Die Effekte beider Opioide an quergestreifter und glatter Muskulatur waren durch anschließende Zugabe von Naloxon (10^{-6} M) signifikant reversibel (Abb.16, Abb.17, Abb.18). In einer separaten Versuchsreihe wurde außerdem untersucht, ob die beobachtete Wirkung von Endomorphin-2 auch durch den selektiven μ -Rezeptorantagonisten CTAP wieder aufgehoben werden kann. In diesen Versuchen war die Endomorphin-2-Wirkung etwas weniger ausgeprägt, war aber durch CTAP (10^{-6} M) ebenfalls signifikant reversibel (quergestreifte M.: Endomorphin-2 10^{-6} M: $-20,4 \pm 2,1$ %, $p < 0,001$, Endomorphin-2 10^{-6} M + CTAP 10^{-6} M: $-6,3 \pm 2,7$ %, $p < 0,01$, n=5; glatte M.: Endomorphin-2 10^{-6} M: $-57,3 \pm 8,7$ %, $p < 0,05$, Endomorphin-2 10^{-6} M + CTAP 10^{-6} M: $-27,0 \pm 2,8$ %, $p < 0,01$, n=5). Beide Antagonisten, Naloxon (10^{-6} M) und CTAP (10^{-6} M), hatten ohne vorherige Zugabe der Agonisten keinen signifikanten Effekt auf die Kontraktionsamplitude der beider Muskeltypen (Tab.6).

Nociceptin (10^{-8} M, 10^{-7} M), als endogener Ligand des ORL_1 -Rezeptors, führte zu keiner signifikanten Änderung der Kontraktionskraft der quergestreiften Muskulatur (10^{-8} M: $-3,2 \pm 1,1$ %, n=5; 10^{-7} M: $-3,9 \pm 0,6$ %, n.s., n=7), inhibierte aber die Kontraktionsantwort der glatten Muskulatur (10^{-8} M: $-13,1 \pm 4,2$ %, $p < 0,05$, n=5; 10^{-7} M: $-34,5 \pm 5,7$ %, $p < 0,001$, n=7). Erwartungsgemäß war diese Inhibition nach Zugabe von Naloxon (10^{-6} M) nicht reversibel (Abb.19).

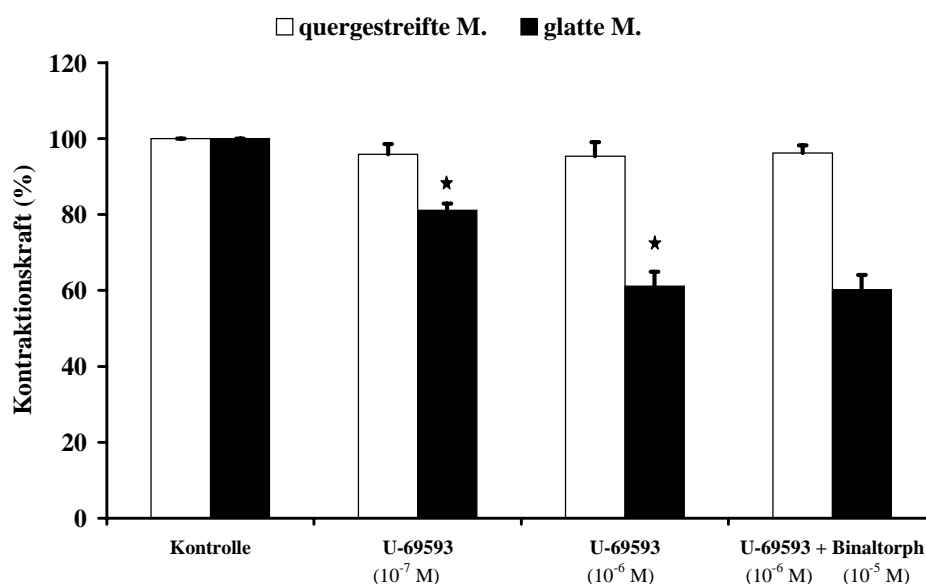


Abbildung 15: Einfluß des κ -Agonisten U-69593 (10^{-7} M, 10^{-6} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe des κ -Rezeptorantagonisten Binaltorphimin (10^{-5} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENV5 (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star = p < 0,05$.

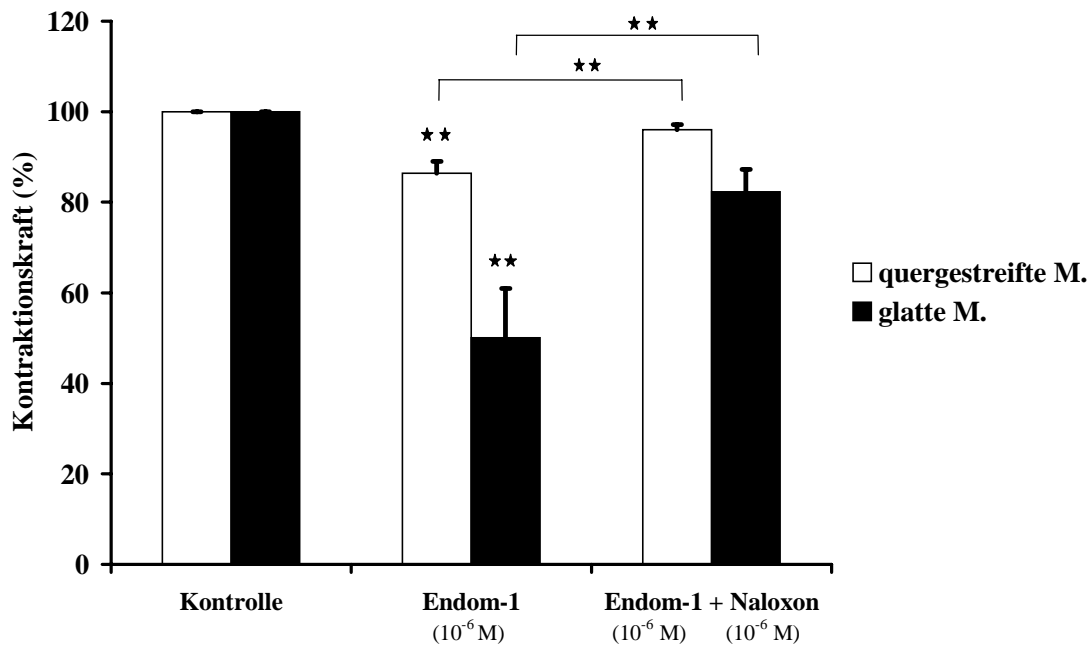


Abbildung 16: Einfluß des μ -Agonisten Endomorphin-1 (10^{-6} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe des Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star\star=p<0,01$.

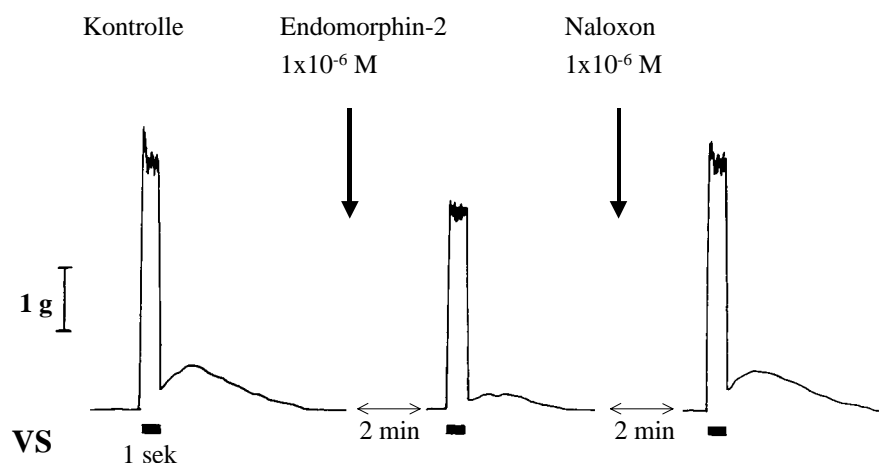


Abbildung 17: Originalaufzeichnungen der Kontraktionsantworten nach vagaler Stimulation vor und nach Zugabe des μ -Rezeptoragonisten Endomorphin-2 (10^{-6} M) und anschließender Inkubation des Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (10^{-6} M). Standardstimulationsparameter: 40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer. VS: Vagale Stimulation.

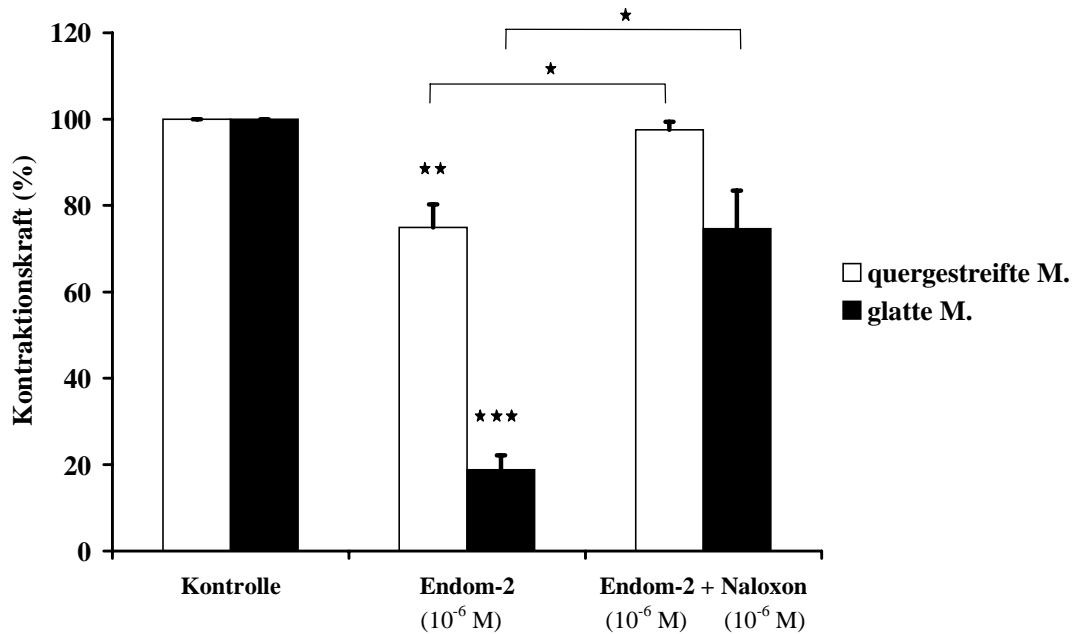


Abbildung 18: Einfluß des μ -Agonisten Endomorphin-2 (10^{-6} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe des Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. \star =p<0,05; $\star\star$ =p<0,01; $\star\star\star$ =p<0,001.

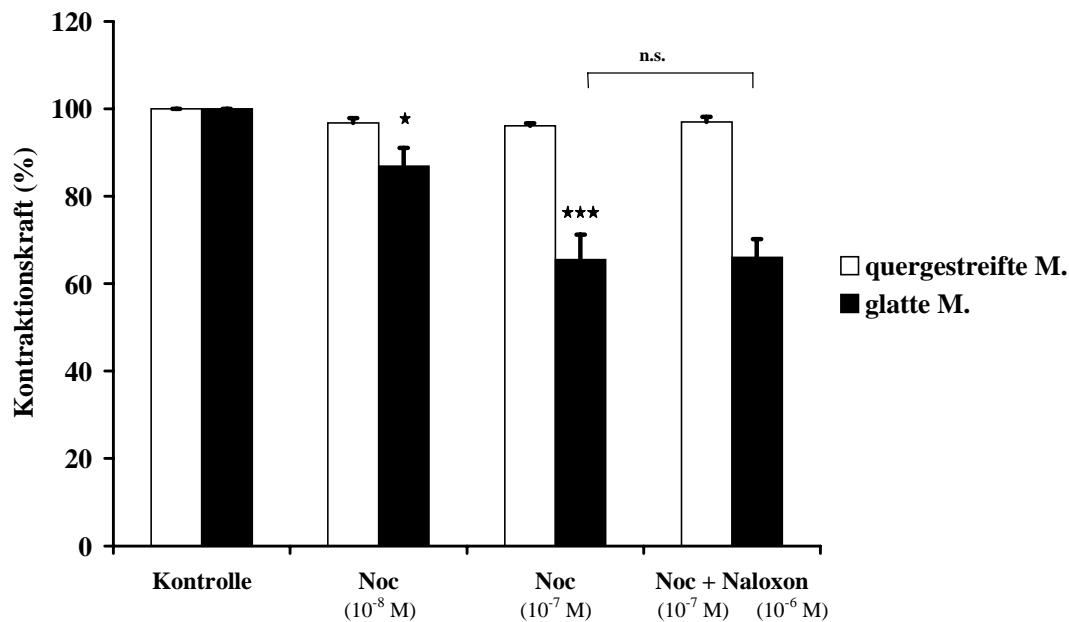


Abbildung 19: Einfluß des ORL₁-Rezeptoragonisten Nociceptin (10^{-8} M, 10^{-7} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe von Naloxon (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. \star =p<0,05; $\star\star$ =p<0,01; $\star\star\star$ =p<0,001.

Substanz	quergestreifte M.	glatte M.
δ-Agonist SNC 80		
10 ⁻⁷ M	-3,3 ± 3,7 %, n.s., n=2	-3,1 ± 0,6 %, n.s., n=2
10 ⁻⁶ M	+1,0 ± 1,4 %, n.s., n=2	-2,3 ± 0,4 %, n.s., n=2
κ-Agonist U-69593		
10 ⁻⁷ M	-4,2 ± 2,8 %, n.s., n=3	-18,9 ± 1,7 %, ★, n=3
10 ⁻⁶ M	-4,6 ± 3,7 %, n.s., n=3	-38,9 ± 3,8 %, ★, n=3
+ κ-Antagonist Binaltorphimin		
10 ⁻⁵ M	-3,8 ± 2,0 %, n.s., n=3	-39,8 ± 3,9 %, n.s., n=3
μ-Agonist Endomorphin-1		
10 ⁻⁶ M	-13,6 ± 2,6 %, ★★, n=6	-49,9 ± 10,8 %, ★★, n=5
+ Naloxon		
10 ⁻⁶ M	-3,9 ± 1,1 %, ##, n=6	-17,7 ± 5,0 %, ##, n=5
μ-Agonist Endomorphin-2		
10 ⁻⁶ M	-25,1 ± 5,3, ★★, n=16	-81,1 ± 3,3, ★★★, n=11
+ Naloxon		
10 ⁻⁶ M	-2,5 ± 1,9 %, #, n=4	-25,4 ± 8,8 %, #, n=4
ORL₁-Agonist Nociceptin		
10 ⁻⁸ M	-3,2 ± 1,1 %, n.s., n=5	-13,1 ± 4,2 %, ★, n=5
10 ⁻⁷ M	-3,9 ± 0,6 %, n.s., n=7	-34,5 ± 5,7, ★★★, n=7
+Naloxon		
10 ⁻⁶ M	-3,0 ± 1,1 %, n.s., n=7	-34,0 ± 4,2 %, n.s., n=7

Tabelle 5: Übersicht über Wirkung der verwendeten spezifischen Agonisten und anschließender Zugabe der Antagonisten der verschiedenen Opioidrezeptoren auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENV5 (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. ★=p<0,05; ★★=p<0,01; ★★★=p<0,001 (vs. Kontrolle). #=p<0,05; ##=p<0,01 (Agonist +Antagonist vs. Agonist); n.s.= nicht signifikant.

Substanz	quergestreifte M.	glatte M.
δ-Antagonist Naltrindol		
10 ⁻⁶ M	-0,8 ± 3,3 %, n.s., n=3	-0,3 ± 1,7 %, n.s., n=3
κ-Antagonist Binaltorphimin		
10 ⁻⁶ M	-0,2 ± 1,1%, n.s., n=3	-2,3 ± 1,2 %, n.s., n=3
unspez. Antagonist Naloxon		
10 ⁻⁶ M	-0,6 ± 2,3 %, n.s., n=4	-1,0 ± 0,9 %, n.s., n=3
μ-Antagonist CTAP		
10 ⁻⁶ M	+2,1 ± 1,1 %, n.s., n=3	-0,5 ± 2,2 %, n.s., n=3

Tabelle 6: Einfluß der verwendeten Antagonisten der verschiedenen Opioidrezeptoren auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. Änderungen der Kontraktionsamplituden erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

3.2.4 Einfluß der nikotinerger Agonisten DMPP und Epibatidin auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

Die beiden selektiven Agonisten ganglionärer nikotinerger Ach-Rezeptoren DMPP und Epibatidin wurden in der Absicht genutzt, um neben der elektrisch induzierten Stimulation extrinsischer Neurone pharmakologisch intrinsische Nerven des ENS zu stimulieren und auf diesem Wege eine mögliche Interaktion zu untersuchen. Weder DMPP (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M) noch Epibatidin (10⁻¹⁰ M- 10⁻⁷ M) veränderten den Tonus der Ösophagus-Vagus-Präparation oder hatten einen Einfluß auf durch Carbachol (10⁻⁵ M) präkontrahierte Muskelstreifen. Nach vagaler Stimulation bewirkte DMPP ab einer Konzentration von 10⁻⁴ M eine ausgeprägte Inhibition der Kontraktionsantwort sowohl der quergestreiften (-82,3 ± 5,9 %, p<0,01, n=5) als auch glatten Muskulatur (-97,7 ± 1,5 %, p<0,01, n=5) (Abb.20, Abb.21). Eine vorherige Inkubation mit L-NNA (10⁻⁴ M) konnte keine signifikante Änderung der Inhibition der beiden Muskeltypen durch DMPP (10⁻⁴ M) demonstrieren (quergestreifte M.: -83,1 ± 5,8 %, n=3; glatte M.: -93,0 ± 3,5 %, n=3) (Tab.7). Auch eine zuvor durchgeführte Zugabe von Hexamethonium (10⁻⁴ M), um eine Ganglienblockade zu erreichen, was natürlich die glatte

Muskelkontraktion inhibierte, änderte nicht das Ausmaß der Inhibition der quergestreiften Muskulatur durch anschließende DMPP-Zugabe ($-88,4 \pm 2,7 \%$, $n=2$).

Das Alkaloid Epibatidin (10^{-10} M- 10^{-7} M) hatte dagegen keinen Effekt auf die Kontraktionsamplitude der quergestreiften Muskulatur, führte aber zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der glatten Muskulatur (10^{-10} M: $-19,7 \pm 13,9 \%$; 10^{-9} M: $-36,8 \pm 18,4 \%$, $p<0,05$; 10^{-8} M: $-90,2 \pm 4,3 \%$, $p<0,001$ 10^{-7} M: $-98,6 \pm 1,5 \%$, $p<0,001$, $n=4$) (Abb.22). Auch hier zeigte sich durch eine Präinkubation mit L-NNA (10^{-4} M) keine Änderung der beobachteten Inhibition der glatten Muskulatur durch Epibatidin (10^{-7} M) ($-95,7 \pm 2,2 \%$, $n=3$) (Tab.7).

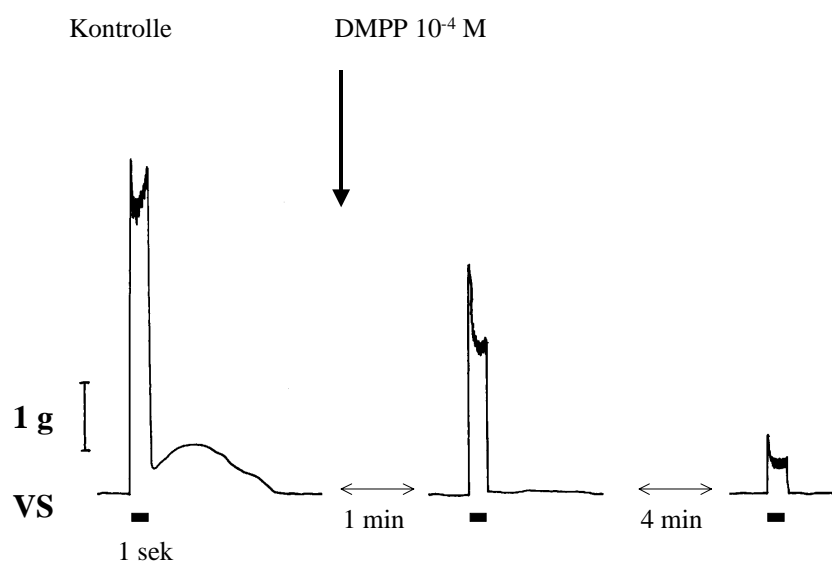


Abbildung 20: Originalaufzeichnungen der Kontraktionsantworten nach vagaler Stimulation vor und nach Zugabe des ganglionären nikotinergen Agonisten DMPP (10^{-4} M). Standardstimulationsparameter: 40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer. VS: Vagale Stimulation.

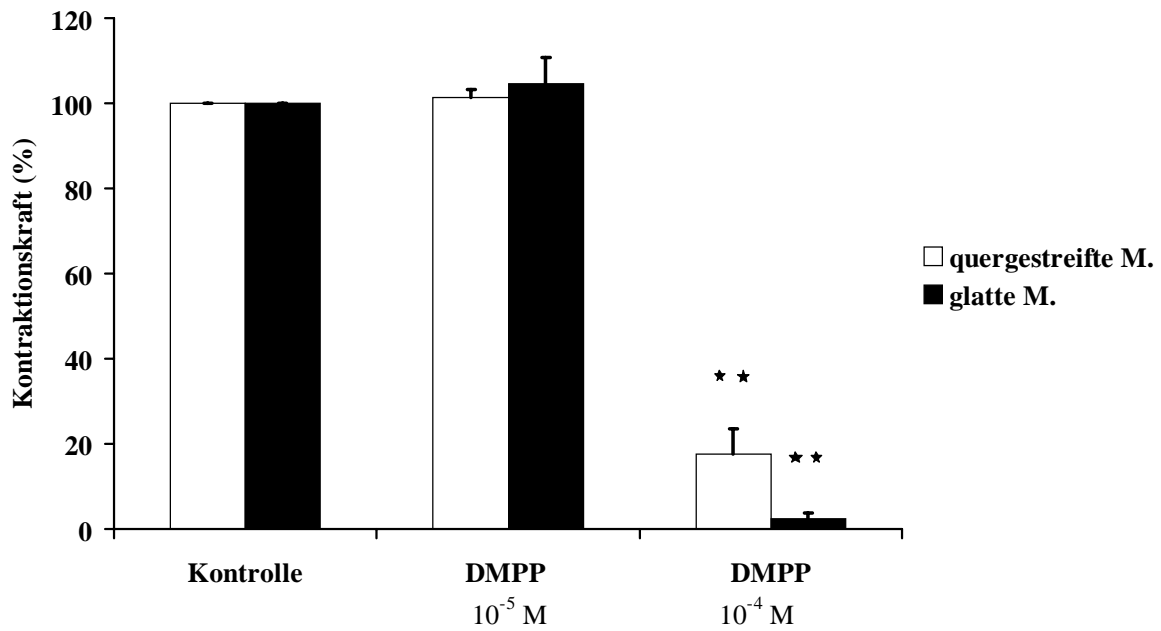


Abbildung 21: Einfluß des ganglionären nikotinergen Agonisten DMPP (10^{-5} M, 10^{-4} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ******= $p < 0,01$.

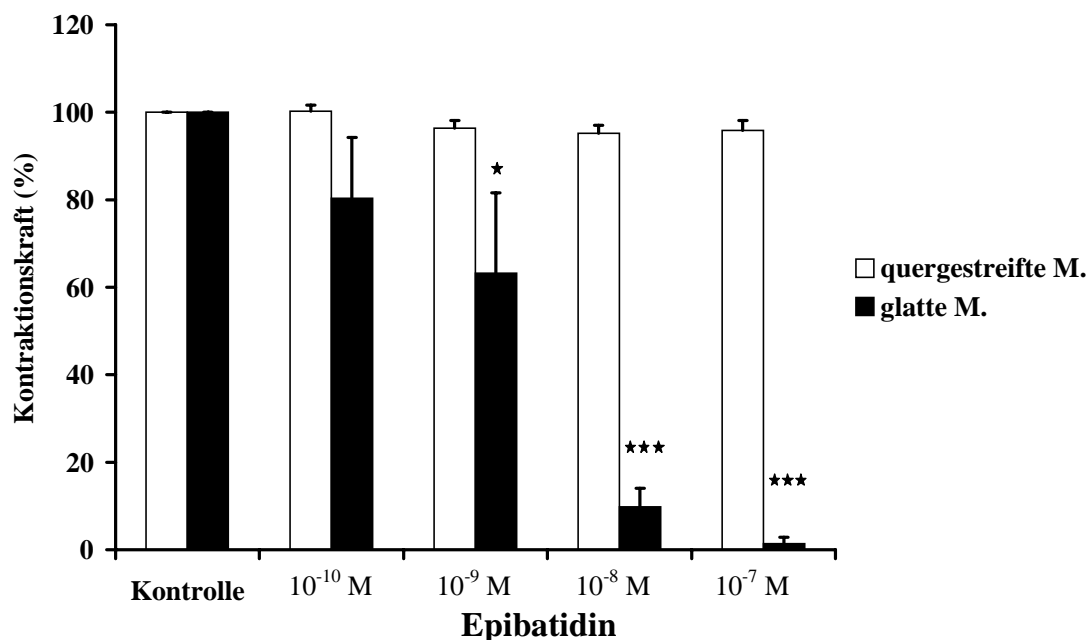


Abbildung 22: Einfluß des ganglionären nikotinergen Agonisten Epibatidin (10^{-10} M- 10^{-7} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. *****= $p < 0,05$; *******= $p < 0,001$.

Substanz	quergestreifte M.	glatte M.
DMPP		
10 ⁻⁵ M	+1,3 ± 1,9 %, n.s., n=3	+4,9 ± 6,1 %, n.s., n=3
10 ⁻⁴ M	-82,3 ± 5,9 %, ★★, n=5	-97,7 ± 1,5 %, ★★, n=5
L-NNA 10 ⁻⁴ M	-83,1 ± 5,8 %, n.s., n=3	-93,0 ± 3,5 %, n.s., n=3
+ DMPP 10 ⁻⁴ M		
Epibatidin		
10 ⁻¹⁰ M	-0,2 ± 1,4 %, n.s., n=4	-19,7 ± 13,9 %, n.s., n=4
10 ⁻⁹ M	-3,7 ± 1,8 %, n.s., n=4	-36,8 ± 18,4 %, ★, n=4
10 ⁻⁸ M	-5,0 ± 1,8 %, n.s., n=4	-90,2 ± 4,3 %, ★★★, n=4
10 ⁻⁷ M	-4,2 ± 2,3 %, n.s., n=4	-98,6 ± 1,5 %, ★★★, n=4
L-NNA 10 ⁻⁴ M	-0,9 ± 0,1 %, n.s., n=3	-95,7 ± 2,2 %, n.s., n=3
+Epibatidin 10 ⁻⁷ M		

Tabelle 7: Übersicht über Wirkung der ganglionären nikotineren Agonisten DMPP (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M) und Epibatidin (10⁻¹⁰ M- 10⁻⁷ M) alleine und in Anwesenheit von L-NNA (10⁻⁴ M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. ★=p<0,05; ★★=p<0,01; ★★★=p<0,001; n.s.= nicht signifikant.

4. Allgemeine Diskussion

4.1 Allgemeiner anatomischer Aufbau des Ösophagus

Der Ösophagus ist ein sehr dehnbarer muskulärer Schlauch, der den Oropharynx mit dem Magen verbindet und für den Transport von Nahrung und Flüssigkeit in den Magen verantwortlich ist. An beiden Enden des Ösophagus sind spezialisierte, tonisch kontrahierte, zirkuläre Muskelbänder lokalisiert, die als Sphinkteren bezeichnet werden. Ihre Kontraktion verschließt das Lumen der Speiseröhre zu beiden Enden und verhindert so den Rückfluß von Mageninhalt in die Speiseröhre bzw. in den Pharynx und in die Atemwege. Der obere Ösophagussphinkter (OÖS) ist eher eine funktionelle Bezeichnung für eine anatomische Struktur, die eindeutig aus muskulären Anteilen des Pharynx besteht (M. constrictor pharyngis medius und inferior) und für die es keine Hinweise einer Beteiligung von Muskelstrukturen des Ösophagus selbst gibt (Code, C. F. et al. 1968, S.1824; Conklin, J. L. et al. 1994, S. 904).

Der Wandaufbau des Ösophaguskörpers, bestehend aus Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica adventitia, spiegelt die typische und in allen Rohrabschnitten des Magen-Darm-Traktes letztlich in prinzipiell gleicher Weise vorkommende Schichtengliederung wieder. Zuinnerst liegt die aus einem nicht verhornenden Plattenepithel und der Lamina propria bestehende Mukosa. Eine kleine Anzahl spezialisierter Zelltypen, wie z.B. Melanozyten, endokrine Zellen und Langerhans-Zellen findet sich in den tieferen Abschnitten der Epithelschicht, während man in der lockeren, retikulär-bindegewebigen Lamina propria vaskuläre Strukturen und vereinzelt Ansammlungen von Leukozyten vorfindet. An der Grenze zur Submucosa liegt eine besonders kräftig ausgeprägte Lage glatter Muskelzellen, die Lamina muscularis mucosae. Die Submucosa besteht aus lockerem Bindegewebe welches Blutgefäße, ein reiches Netzwerk an Lymphgefäßen, vereinzelt Leukozyten mit gelegentlichen Lymphfollikeln und muköse Speicheldrüsen (Glandulae oesophagae) enthält. Außerdem ist die Mukosa des Ösophagus reich an Nervenfasern und enthält die Ganglien des Plexus submucosus (Meissner). Der Submucosa folgt die Tunica muscularis propria, die aus einer inneren „Ringmuskelschicht“ und einer äußeren Längsmuskelschicht aufgebaut ist, zwischen denen sich die Ganglien des Plexus myentericus (Auerbach) befinden. Obwohl die innere Muskelschicht der Muscularis propria auch heute

noch häufig als zirkulär beschrieben wird, so ist der Muskelfaserverlauf genau genommen in den oberen zwei Dritteln elliptisch und im unteren Drittel helikal. Die Adventitia verbindet den Ösophagus durch lockeres Bindegewebe mit der Umgebung, wobei im Gegensatz zum übrigen Gastrointestinaltrakt eine peritoneale Überkleidung durch eine Tunica serosa fehlt (Crawford, J. M. 1999, S.776).

Der muskuläre Wandaufbau der Muscularis propria des Ösophagus weist Unterschiede bei den verschiedenen Tierspezies auf: Die meisten Säugetiere, wie z. B. alle Nagetiere, darunter der Hase (Harting, K. 1934, S.631), die Ratte (Gruber, H. 1968, S.237-239), die Maus oder das Meerschwein (Ingelfinger, F. J. 1958, S.551), alle Wiederkäuer (Conklin, J. L. et al. 1994, S.905), die meisten Fleischfresser (Carnivores), wie z. B. der Hund (Lawrentjew, B. J. 1929, S.235-240), aber auch die Fledermaus, der Elefant oder die Giraffe (Ingelfinger, F. J. 1958, S.551) besitzen eine Muscularis propria, die in ihrer gesamten Länge aus quergestreifter Muskulatur besteht. Die Muscularis propria von Amphibien, Reptilien und Vögeln ist dagegen gänzlich aus glatten Muskelfasern aufgebaut (Oppel, A. 1897). Beim Menschen, bei der Katze und bei einigen Beuteltieren, wie dem in der experimentellen Forschung häufig benutzten Amerikanischen Opossum (*Didelphis virginiana*), findet man in der Muscularis ausschließlich quergestreifte Muskulatur nur im oberen Drittel des Ösophagus, die sich im mittleren Drittel mit glatter Muskulatur vermischt und im unteren Drittel gänzlich von glatter Muskulatur ersetzt wird, wo nur noch gelegentlich einzelne quergestreifte Muskelfasern zu finden sind (Conklin, J. L. et al. 1994, S.905-906, Crawford, J. M. 1999, S.776). Franz J. Ingelfinger resumierte in seiner ausführlichen Übersichtsarbeit von 1958 „Esophageal Motility“ in „Physiological Reviews“, in der er die bis dato schon fast unüberschaubare Fülle an Information zum Schluckakt mit akribischer Genauigkeit analysierte, daß trotz der unterschiedlichen Anatomie der Muskelwand des Ösophagus der verschiedenen Spezies, das gemeinsame Resultat, nämlich peristaltische Kontraktionen, außergewöhnlich uniform verläuft (Ingelfinger, F. J. 1958, S.551).

Der untere Ösophagussphinkter (UÖS) ist eine physiologisch definierte muskuläre Struktur am gastroösophagealen Übergang mit einem im Gegensatz zum übrigen Ösophagus erhöhten intraluminalen Druck. Anatomisch betrachtet ist dieser Muskelwulst eine Fortsetzung der inneren und äußeren Muscularis des Ösophaguskörpers und besteht bei allen Spezies aus glatter Muskulatur.

Die Funktion des Ösophagus, Nahrung und Flüssigkeit vom Pharynx in den Magen zu befördern, geschieht in einem Zusammenspiel zwischen OÖS, Ösophaguskörper und UÖS, in

welchem der Bolus nach kurzzeitiger Öffnung des OÖS, peristaltischer Kontraktionen des Ösophagus und anschließender Relaxation des UÖS den Magen erreicht, wonach sich der UÖS wieder tonisch kontrahiert. Die Mechanismen, die diese motorische Aktivität beim Schluckakt steuern, sind hoch komplex und involvieren sowohl Reflexbögen der extrinsischen Innervation als auch intrinsische Innervation durch das ENS.

Bevor auf die genauere Innervation und Steuerung der Motilität des Ösophaguskörpers näher eingegangen wird, soll kurz der grobe Bewegungsablauf der einzelnen beim Schluckakt beteiligten Strukturen, beschrieben werden. Unterschiede im Bewegungsablauf des Schluckaktes zwischen den verschiedenen Säugetieren erscheinen allenfalls quantitativ, während auf Unterschiede in der Steuerung der Peristaltik auf neuronaler Ebene später hingewiesen wird.

4.2 Der Schluckakt

Der Schluckakt gliedert sich in eine willkürlich steuerbare orale Phase sowie eine reflektorisch ablaufende pharyngeale Phase und eine ösophageale Phase, in der der Bolus durch peristaltische Wellen des Ösophagus in den Magen transportiert wird.

4.2.1 Orale und pharyngeale Phase

Die Vorbereitung des Schluckaktes beginnt mit der willkürlich gesteuerten oralen Phase, in der die Nahrung zuerst durch Kauen und mit Hilfe der Zunge zu einem Bolus portioniert wird und mit der Zungenspitze anschließend zwischen Zungengrund und harten Gaumen geschoben wird. Lippen und Kiefer verschließen sich, und die Zunge hebt sich von anterior nach posterior gegen den Gaumen. Diese Bewegung der Zunge zuerst gegen den harten, dann gegen den weichen Gaumen befördert den Bolus in den Pharynx. Wenn der Bolus den Pharynx erreicht hat, so folgt diesen willkürlich gesteuerten Bewegungsabläufen nun ein unwillkürlicher Reflexablauf (=Schluckreflex). In der pharyngealen Phase wird der Schluckreflex hauptsächlich durch Kontakt des Bolus mit der posterioren Oberfläche der Zunge über afferente Nervenfasern des N. glossopharyngeus und des oberen laryngealen Astes des N. vagus ausgelöst. Die motorischen Neurone, welche die über 20 verschiedenen

am Schluckakt beteiligten Muskeln des Pharynx versorgen, sind in 6 Hauptgruppen angeordnet und liegen in den motorischen Kernen der Nn. trigeminus, facialis, glossopharyngeus, hypoglossus, im Ncl. ambiguus des N. vagus sowie in den spinalen Segmenten C₁-C₃. Nach Umschaltung der afferenten Impulse im Schluckzentrum läuft der komplexe Schluckvorgang eigengesetzlich und unwillkürlich weiter ab. Sobald der Bolus den Pharynx erreicht hat, hebt sich der weiche Gaumen gegen die kontrahierten palatopharyngealen Muskeln, so daß der Nasopharynx vom Oropharynx abgeschlossen ist und nasopharyngealer Reflux verhindert wird. Die Atmung wird kurz reflektorisch unterbrochen, durch Kontraktion der Larynxmuskulatur erhebt sich der Kehlkopf, verschließt den Atemweg und nach Öffnung des OÖS gleitet der Bolus über die verschlossene Epiglottis in den Ösophagus. Der Transport des Bolus durch den Pharynx wird dabei erleichtert zum einen durch eine schon frühzeitige Verkürzung des Pharynx, was den OÖS näher an die Zungenbasis bringt und den Sinus piriformis und den Kehlkopfvorhof verschließt, wobei die Pharynxmuskulatur so lange verkürzt bleibt, bis der Bolus den gesamten Pharynx passiert hat. Zum anderen wird die Passage des Bolus durch kraniokaudale peristaltische Kontraktionen der posterioren Pharynxmuskulatur erleichtert, welche den Bolus in den Ösophagus pressen. Die Geschwindigkeit mit der der Bolus den Pharynx passiert liegt bei etwa 15 cm/s, so daß die Passagezeit von Beginn des Schluckreflexes bis zum Erreichen des OÖS nur knapp 0,3 s dauert. Die Relaxation des tonisch kontrahierten OÖS geschieht während der peristaltischen Kontraktion der Pharynxmuskulatur und setzt schon kurz nach Beginn des Schluckakts ein. Die Relaxation des OÖS dauert zwischen 0,5 und 1 s, gefolgt von einer anschließenden tonischen Kontraktion, die im Vergleich zum Ruhetonus des OÖS doppelt so stark sein kann. Diese tonische Nachkontraktion dauert etwa 1 s, bevor der Ruhetonus wieder eintritt.

4.2.2 Ösophageale Phase

Eine kaudal fortschreitende Kontraktion der zirkulären Muskulatur der Muscularis propria beginnt am oberen Ende des Ösophagus und erscheint als Fortsetzung der tonischen Nachkontraktion des OÖS. Mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 4 cm/s beim Menschen passiert die peristaltische Welle die gesamte Länge des Ösophagus in gerade mal 5-6 s, wobei die Geschwindigkeit im mittleren Ösophagus am größten ist. Die Kontraktionsdauer der zirkulären Muskulatur beträgt in den verschiedenen Abschnitten 2-4 s und nimmt nach distal zu. Während die Binnendrucke des menschlichen Ösophagus bei

Ruheatmung 4-6 mm Hg unter dem Atmosphärendruck betragen, so erreichen die Binnendrucke beim Schluckakt je nach Höhenlokalisierung 35-70 mm Hg. Die höchsten intraluminalen Druckwerte werden dabei im distalen Ösophagus gemessen. Es sei darauf hingewiesen, daß Passagezeit des Bolus und die Druckamplituden abhängig von Bolusgröße, Alter der Versuchsperson, Temperatur und intraabdominalen Druck erheblich variieren können. In der ösophagealen Phase findet auch eine Verkürzung der longitudinalen Muskulatur der Muscularis propria statt, die ebenso peristaltikartig von kranial nach kaudal fortschreitet, aber zeitlich der Kontraktion der zirkulären Muskulatur vorausseilt.

Die Relaxation des UÖS beginnt ca. 2-3 s nach Auslösung des Schluckreflexes und damit auch erst nach Einsetzen der Peristaltik im Ösophagus. Die Relaxation dauert zwischen 5 und 10 s, der wie beim OÖS eine ca. 2 s lange Nachkontraktion folgt, wonach der UÖS wieder seinen Ruhetonus einnimmt (Conklin, J. L. et al. 1994, S.912).

Die hier beschriebene Peristaltik des Ösophaguskörpers, welche im Rahmen des Schluckaktes durch den Schluckreflex ausgelöst wird, bezeichnet man als primäre Peristaltik. Eine sekundäre Peristaltik entsteht durch afferente Impulse vom Ösophagus selbst (z.B. durch mechanische, thermische oder chemische Reizung). So führen z.B. Reste eines Bissens, welche den Magen durch die primäre Peristaltik nicht erreicht haben, zur Auslösung sekundärer Peristaltik. Von tertiären Kontraktionen spricht man hingegen, wenn unkoordinierte segmentale Kontraktionen auftreten.

4.3 Innervation des Ösophagus

In keinem Abschnitt des Gastrointestinaltraktes ist das räumliche Aufeinandertreffen von extrinsischem und intrinsischem Nervensystem so offensichtlich wie im Ösophagus. Schon makroskopisch kann man erkennen, daß extrinsische Nervenfasern des N. vagus - das sind Nervenfasern deren Zellkörper außerhalb des Gastrointestinaltraktes liegen und der Kontrolle des ZNS unterliegen - zu der muskulären Wand des Ösophagus projizieren, einem Organ, welches genauso wie der übrige Gastrointestinaltrakt der Sitz von intrinsischen Neuronen des enterischen Nervensystems (ENS) ist. Das ENS, welches sämtliche Neurone in der Wand des Gastrointestinaltraktes vom Beginn des Ösophagus bis zum Sphincter ani externus, dazu die Neurone des Pankreas und der Gallenwege umfaßt, steuert die Motilität, exokrine und endokrine Sekretion und Mikrozirkulation des Gastrointestinaltrakts. Seit den in vitro-

Versuchen an denervierten Darmschlingen von Bayliss und Starling wissen wir ob der engen Verbindung zum extrinsischen autonomen Nervensystem des ZNS von der beachtlichen Unabhängigkeit des ENS (Bayliss, W. M. et al. 1899, S.99). Als sie 1899 „the law of intestine“ formulierten („local stimulation of the gut produces excitation above and inhibition below the excited spot“), haben sie den Ösophagus nicht ausdrücklich miteingeschlossen. Während die übrigen Anteile des Gastrointestinaltrakts, in denen die Innervation durch Sympathikus und Parasympathikus eine eher rein modulierende Funktion ausübt, auch nach Abtrennung des extrinsischen Nervensystems ihre Funktionstüchtigkeit weitgehend beibehalten, so ist eine Notwendigkeit des ENS in der Wand des Ösophagus auf den ersten Blick nicht ganz klar: Die meisten Säugetiere besitzen eine Muscularis, die in ihrer gesamten Länge aus quergestreifter Muskulatur besteht und deren peristaltische Bewegungen zentral gesteuert über somatomotorische Nervenfasern des N. vagus vermittelt werden, die unverschaltet in den Ganglien des ENS direkt die Muskulatur innervieren. Gibt es da überhaupt eine Möglichkeit für das ENS einzugreifen? Aufgrund der Eigenständigkeit des ENS und der Tatsache, daß das numerische Verhältnis von extrinsischen Vagusfasern, die den Darm innervieren, zu der Gesamtzahl enterischer Neurone etwa 1:100 000 beträgt, ist die Bezeichnung für das ENS von Langley, der es 1921 das „little brain of the gut“ nannte (Langley, J. N. 1921), sicherlich sehr treffend. Doch zumindest im Ösophagus von Säugetieren, deren Muscularis propria gänzlich aus quergestreifter Muskulatur besteht, bleibt die Funktion des ENS rätselhaft. Aber auch beim Menschen oder bei Tieren mit glatter Muskulatur in der Muscularis des distalen Ösophagus erscheint der Einfluß des ENS auf die Motilität des Ösophagus nach kranial abzunehmen, ganz so, als ob der „IQ des Gehirns des Gastrointestinaltraktes“ in den Abschnitten des Verdauungstraktes mit quergestreifter Muskulatur niedriger ist.

Die extrinsische und intrinsische Innervation des Ösophaguskörpers soll am Beispiel der Ratte beschrieben werden, wo sie durch neuroanatomische und pharmakologische Studien gut untersucht ist. Auf Speziesunterschiede, besonders bei Säugetieren, in denen die Muscularis propria nicht gänzlich aus quergestreifter Muskulatur besteht, wird im Text gesondert hingewiesen.

4.3.1 Extrinsische Innervation des Ösophagus

Der Ösophaguskörper der Ratte erhält seine extrinsische Innervation hauptsächlich über somatomotorische, viszeromotorische und viszerosensible Fasern der beiden Nn. vagi, deren Kerngebiete in der Medulla oblongata liegen (Ncl. ambiguus, Ncl. dorsalis n. vagi und Ncl. solitarius). Der zervikale Anteil des Ösophagus wird durch die beiden Nn. recurrentes innerviert, der thorakale Anteil durch kleine Äste der beiden Nn. vagi, den Rr. oesophagi.

Die Nervenfasern, die die quergestreifte Muskulatur der Muscularis propria innervieren, sind somatomotorischer Qualität und haben ihren Ursprung in den rostralen Anteilen des Ncl. ambiguus in der Medulla oblongata. Dieser rostrale Teil des Ncl. ambiguus wird im englischen Schrifttum auch als sogenannte „compact formation“ bezeichnet. Ohne synaptische Verschaltung bilden sie mit der quergestreiften Muskulatur motorische Endplatten aus. Interessanterweise besitzen diese Nervenfasern keine Myelinscheiden, obwohl sie quergestreifte Muskulatur innervieren (Gruber, H. 1978a, S.174-178; Gruber, H. 1968, S.236). Als Überträgerstoff an der motorischen Endplatte fungiert Acetylcholin (Ach), welches nikotinerge Ach-Rezeptoren der quergestreiften Muskulatur aktiviert. In den vagalen Nervenendigungen konnte immunhistochemisch auch das Neuropeptid CGRP („calcitonin gene-related peptide“) in großer Menge lokalisiert werden (Lee, B. H. et al. 1992, S.531; Neuhuber, W. L. et al. 1994, S.23), welches eine Funktion als Co-Transmitter besitzen könnte, dessen genaue funktionelle Bedeutung aber nicht geklärt ist. Erst kürzlich konnte im Gegensatz zu Ergebnissen früherer Untersuchungen (Gruber, H. 1978b, S.46) gezeigt werden, daß die Motoneurone im Ncl. ambiguus des linken bzw. rechten N. vagus überwiegend jeweils die ipsilaterale Seite der Muscularis propria versorgen (Neuhuber, W. L. et al. 1998, S. 96). Eine direkte Projektion von Motoneuronen des Ncl. ambiguus zu Ganglien des Plexus myentericus zwischen den beiden Schichten der quergestreiften Muskulatur der Muscularis propria konnte nicht nachgewiesen werden (Neuhuber, W. L. et al. 1998, S. 99).

Die glatten Muskelfasern der Lamina muscularis mucosae erhalten eine extrinsische Versorgung durch Nervenfasern des N. vagus, deren Perikaryen im parasymphatischen Ncl. dorsalis n. vagi in der Medulla oblongata liegen. In pharmakologischen Studien konnte nach vagaler Stimulation demonstriert werden, daß die vagalen Fasern in den Ganglien des Plexus myentericus oder submucosus synaptisch auf ein postganglionäres zweites Neuron verschaltet werden, bevor eine Erregung der Muscularis mucosae resultiert. Wie bei nahezu allen parasymphatisch innervierten Organen ist der Transmitter der synaptischen Übertragung hier

jeweils Acetylcholin, wobei die ganglionären Ach-Rezeptoren nikotinerg, die Ach-Rezeptoren der glatten Muskulatur muskarinerg sind (Bieger, D. et al. 1985, S.104; Kerr, K. P. et al. 1995a, S.217-219). Der genaue Ort der synaptischen Verschaltung der präganglionären vagalen Nervenfasern, ob in den Ganglien des Plexus myentericus oder submucosus, ist nicht gänzlich geklärt. Überraschenderweise beobachteten Neuhuber et al. nach Injektion von anterograden Tracer-Substanzen in den Ncl. dorsalis n. vagi, daß nur knapp 10 % der myenterischen Ganglien eine klassische präganglionäre Innervation von Nervenzellen des Ncl. dorsalis n. vagi erhalten, während eine Innervation der Ganglien des Plexus submucosus gar nicht zu bestehen scheint (Neuhuber, W. L. et al. 1998, S.96). Untersuchungen von Kamikawa et al. an einer isolierten Muscularis mucosae-Präparation am Meerschwein, in der die vagale Innervation intakt blieb und die Muscularis propria mit dem dazwischenliegenden myenterischen Plexus weitgehend entfernt wurde, konnten dagegen zeigen, daß eine vagale Stimulation trotzdem zu einer Kontraktion der Muscularis mucosae führt. Zudem führte die ganglionäre Stimulation isolierter Muskelstreifen der Muscularis mucosae zu einer Kontraktion, was darauf hindeutet, daß zumindest ein Teil der präganglionären parasympathischen Fasern in den Ganglien des Plexus submucosus synaptisch verschaltet werden (Kamikawa, Y. et al. 1979, S.226-230).

Bei Spezies, deren Muscularis propria im unteren Abschnitt aus glatter Muskulatur besteht, erfolgt die extrinsische Innervation dieses Abschnitts im Wesentlichen so, wie für die Muscularis mucosae beschrieben: Hier projizieren ebenfalls cholinerge präganglionäre Nervenzellen aus dem Ncl. dorsalis n. vagi in die Wand des Ösophagus, wo sie über nikotinerge aber teils auch muskarinerge Rezeptoren Nervenzellen des myenterischen Plexus aktivieren, die wiederum die glatte Muskulatur versorgen (Conklin, J. L. et al. 1994, S.907).

Parasympathische, bipolare Nervenzellen im Ganglion cervicale inferius (Ganglion nodosum) innervieren den Ösophagus mit afferenten Nervenfasern, die ebenfalls im N. vagus verlaufen und das zentrale Nervensystem mit sensorischer Information versorgen. Die Axone dieser vagalen sensorischen Neurone bilden vor allem an Ganglien des myenterischen Plexus komplexe laminäre Verzweigungen aus, die als intraganglionäre laminäre Endigungen (IGLEs) bezeichnet werden. Neuhuber et al. konnten anhand von histologischen Untersuchungen nach Injektion von Tracer-Substanzen in das Ganglion nodosum zeigen, daß über 90 % der myenterischen Ganglien durch solche Strukturen versorgt werden. Dagegen weist die Mucosa mit Ausnahme des oralen Anteils nur eine spärliche Innervation durch die IGLEs auf (Neuhuber, W. L. et al. 1998, S.97-99). Man nimmt an, daß diese IGLEs das strukturelle Äquivalent muskulärer Spannungsrezeptoren sind. Die afferenten Neurone

projizieren organotopisch mit ihren zentralen Fortsätzen in den Subnucleus centralis, einen medialen Anteil des Ncl. solitarius. Nervenzellen des Subnucleus centralis wiederum projizieren streng organotopisch gegliedert in die „compact formation“, also in die Anteile des Ncl. ambiguus, die motorisch die Tunica muscularis des Ösophagus versorgen. Dieser einfache Kreis aus drei Neuronen stellt den Reflexbogen dar, der z. B. nach Dehnung der Ösophaguswand zu einer Kontraktion der quergestreiften Muskulatur führt. Die Zellen des Subnucleus centralis spielen also eine Rolle als sekundär sensorische Neurone zum einen und als Prämotorneurone zum anderen und bilden das Bindeglied zwischen afferentem und efferentem Schenkel reflexinduzierter Peristaltik oder sekundärer Peristaltik bei der Ratte (Bieger, D. 1993, S.205-207; Broussard, D. L. et al. 1998, S.1270-1271; Lu, W. Y. et al. 1998, S.R1433-1434). Die Neurone des Subnucleus centralis, welche die Motoraktivität der Ncl. ambiguus Neurone steuern, erhalten neben den vagalen afferenten Nervenfasern auch Projektionen von zentralen Strukturen, wie dem Schluckzentrum. Die Strukturen des Schluckzentrums sind hauptsächlich bilateral in der *Formatio reticularis* im Hirnstamm dorsal des oberen Pols des Ncl. olivarius inferior lokalisiert (Conklin, J. L. et al. 1994, S.913). Das Schluckzentrum erhält wiederum reichlich Afferenzen aus pharyngealen, kortikalen und subkortikalen Strukturen, welche den Schluckvorgang erst ermöglichen bzw. erleichtern. Die Neurone des Subnucleus centralis sind aber auch hier wichtige Schaltstellen bei der Steuerung der willkürlich induzierten oder primären Peristaltik, welche durch den Schluckreflex ausgelöst wird.

Der Ösophaguskörper erhält außerdem auch eine sympathische Innervation durch postganglionäre Nervenfasern aus den zervikalen Ganglien (*Ganglion cervicale medius et superius*), die sich dem Verlauf des N. vagus in der oberen Thoraxhälfte anschließen und zu Ganglien des Plexus myentericus und submucosus und kleinen Blutgefäßen projizieren. Einzelne sympathische Nervenfasern erreichen den Ösophagus auch über die *Nn. splanchnici* via das *Ganglion coeliacum*. Der Einfluß sympathischer Nervenfasern auf die Motilität des Ösophagus, zumindest der Ratte bzw. des Meerschweins scheint aber allenfalls gering (Bieger, D. et al. 1985, S.104; Kamikawa, Y. et al. 1979, S.230).

4.3.2 Intrinsische Innervation des Ösophagus

4.3.2.1 Myenterischer Plexus

1911 vermutete Cannon, daß es im oberen Anteil des menschlichen Ösophagus keine Ganglienzellen zwischen den Schichten der Muscularis propria gibt, einfach deswegen, weil Ganglienzellen dort zwischen quergestreifte Muskulatur nicht hingehören (Cannon, W. B. 1911). Die anatomische Unterstützung für diese Ansicht bekam er von Greving, der versicherte, daß Ganglienzellen des myenterischen Plexus genauso wie die glatten Muskelzellen der Muscularis propria erst erst ca. 10 cm unterhalb des Schildknorpels in der Wand des Ösophagus vorkommen (Greving, R. 1920, S.327), doch bald fanden Jurica und Irwin 1926 bzw. 1931 die Zellen des Auerbach'schen Plexus auch im gesamten menschlichen Ösophagus und eben auch in Tierspezies, deren Muscularis propria vollständig aus quergestreifter Muskulatur besteht (Irwin, D. A. 1931, S.141; Jurica, E. J. 1926, S.371). Heute weiß man, daß die Ganglien des myenterischen wie auch des submukösen Plexus, genauso wie im übrigen Gastrointestinaltrakt, fester Bestandteil des Wandaufbaus des Ösophagus sind, ob dessen Muscularis propria nun quergestreifte oder glatte Muskulatur aufweist (Conklin, J. L. et al. 1994 S.906-909; Ingelfinger, F. J. 1958 S.552-553). Die Frage nach der Funktion der myenterischen Ganglien zwischen den Schichten der quergestreiften Muskulatur ist nicht neu, da man die monosynaptische Innervation der quergestreiften Muskulatur kannte, während man die myenterischen Ganglien in den Abschnitten mit glatter Muskulatur als Schaltstellen für die Aktivierung der Muskulatur durch den N. vagus erachtete. Bartlet konnte 1968 am Meerschwein zeigen, daß die neuromuskuläre Übertragung der quergestreiften Muskulatur nach vagaler Stimulation durch pharmakologische Blockierung der Endplatte mit Tubocurarin vollständig unterbrochen werden kann, Ganglienblockade aber keinen Einfluß auf die Kontraktionskraft der Muskulatur hatte (Bartlet, A. L. 1968, S.171-172). Diese Beobachtungen wurden neben neueren Untersuchungen am Meerschwein (Kerr, K. P. et al. 1995a, S.215-216; Kerr, K. P. et al. 1995b, S.1003) auch am Ösophagus der Ratte bestätigt (Gruber, H. 1978a, S.172). Eine direkte Beteiligung an der Steuerung der Kontraktibilität des quergestreiften Muskelanteils erschien unwahrscheinlich, obwohl Jurica schon 1926 eine bemerkenswerte Entdeckung machte: Während die Denervation quergestreifter Muskulatur des Bewegungsapparates normalerweise schon bald zu Atrophiezeichen der Muskeln führt, zeigte die Muscularis propria in Tieren, deren Muscularis aus quergestreifter Muskulatur besteht, nach beidseitig hoher Vagotomie keinerlei Atrophiezeichen (Jurica, E. J. 1926 S.371).

Diese Entdeckung veranlaßte Gruber 1978 erst viel später, dem myenterischen Plexus zwischen den Schichten quergestreifter Muskulatur zumindest eine trophische Funktion einzuräumen, die einer Atrophie der Muskelfasern entgegenwirkt (Gruber, H. 1978b, S.42).

In unzähligen Versuchen in den letzten 100 Jahren hat sich mittlerweile zudem die Ansicht etabliert, daß der Schluckvorgang und der damit verbundene Ablauf der Peristaltik des Ösophaguskörpers bei Säugetieren, deren Muscularis aus quergestreifter Muskulatur besteht, in einem medullären neuronalen Netzwerk vorprogrammiert ist, welches via vagovagaler Reflexbögen moduliert wird oder in Form der sekundären Peristaltik direkt nach z.B. Dehnung der Muskelwand durch vagovagale Reflexe ausgelöst wird. In beiden Fällen, ob nun primäre oder sekundäre Peristaltik, erachtet man Strukturen in der Medulla oblongata, wie z.B. den Subnucleus centralis, als Schrittmacher und Koordinator der rhythmischen Peristaltik der Ösophaguswand, wobei der myenterische Plexus dabei keine direkte Rolle zu spielen scheint (Bieger, D. 1993, S.203; Cunningham-ET, Jr et al. 1990, S.40-47; Lu, W. Y. et al. 1998, S.R1434). Einige dieser teils schon lange zurückliegenden Versuche machen dies deutlich: Elektrische Stimulation des Vagusstumpfes unter verschiedenen Stimulationsparametern des denervierten Ösophagus der Ratte resultiert in einer simultanen Kontraktion der quergestreiften Muskulatur und eben nicht in einer kraniokaudalen progressiven Peristaltik, wie es zu erwarten wäre, wenn die peristaltischen Kontraktionen in den Ganglien koordiniert würden. Gruber konnte darüberhinaus demonstrieren, daß nach einseitiger Vagotomie mit Reimplantation des Nerven in den M. sternohyoideus, der dort mit den Muskelfasern innerhalb von 8 Wochen motorische Endplatten ausbildete, die Auslösung des Schluckreflexes zu Kontraktionen des reinnervierten Muskels führten, parallel zu der Peristaltik des durch den andern N. vagus noch innervierten Ösophagus (Gruber, H. 1978a, S.174). Während intraluminale Dehnung der Ösophaguswand zu einer geordneten (sekundären) Peristaltik der Muskulatur führt, zeigten 1947 Hwang et al., daß diese nach beidseitiger Vagotomie am Hund nicht mehr zu beobachten war, was die Abhängigkeit der sekundären Peristaltik von der Intaktheit vagovagaler Reflexbahnen verdeutlichte. Sie beschrieben aber anstelle der peristaltischen Kontraktion eine leichte tonische Kontraktion des Ösophagus als Antwort auf die intraluminale Dehnung (Hwang, K. et al. 1947, S.429). Gruber, der schon 1968 ultrastrukturelle Unterschiede zwischen den Axonen an der motorischen Endplatte der quergestreiften Muskulatur des Rattenösophagus erkannte, vermutete später eine Art Koinnervation der quergestreiften Muskulatur durch myenterische Nervenzellen und interpretierte die tonische Kontraktion des Hundeösophagus nach Vagotomie als Folge einer geringen intrinsischen Reflexbahn (Gruber, H. 1978b, S.51).

Dieser intrinsische Reflexweg konnte bis heute nicht nachgewiesen werden und lassen die von Hwang et al. beobachtete tonische Kontraktion des denervierten Ösophagus nach intraluminaler Dehnung rätselhaft erscheinen. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen wäre, daß es sich bei der beobachteten tonischen Kontraktion um eine Kontraktion der Muscularis mucosae handelte, deren glatte Muskelfasern auch nach beidseitiger Vagotomie noch reichlich Innervation von enterischen Ganglien erhalten, wobei intrinsische Reflexbahnen im Falle der Muscularis mucosae wahrscheinlich sind. Gruber war der erste, der anhand histologischer Untersuchungen die These einer dualen bzw. sogar plurineuronalen Innervation der quergestreiften Muskulatur aufstellte (Gruber, H. 1978b, S.51), doch gerade wegen der modernen Auffassung von der Steuerung der ösophagealen Peristaltik im Falle von Säugetieren, deren Muscularis propria gänzlich aus quergestreifter Muskulatur besteht, in der intrinsische Mechanismen keine Rolle zu spielen scheinen, erschien diese These fraglich.

Gut 15 Jahre später griffen Neuhuber und Worl die Frage nach einer Koinnervation der quergestreiften Muskulatur mit Hilfe von modernen immunhistochemischen Untersuchungsmethoden wieder auf, nachdem Grozdanovich et al. Nervenfasern in der quergestreiften Muskulatur des Ösophagus der Maus entdeckten, welche massenhaft NADPH-Diaphorase (NADPH-d) enthielten (Grozdanovic, Z. et al. 1992, S.225), ein Enzym, welches im Gehirn und anderen peripheren neuronalen Geweben fast immer mit dem Enzym NO-Synthase identisch ist (Dawson, T. M. et al. 1991, S.7798-7800). Neuhuber und Worl konnten auch in der quergestreiften Muskulatur des Rattenösophagus diese NADPH-Diaphorase-haltigen varikösen Nervenendigungen beobachten und wiesen durch Doppelfärbungen tatsächlich die Kollokalisierung von NO-Synthase in diesen Axonen nach. Sie konnten auch eindeutig darlegen, daß die NOS/NADPH-d-positiven Neurone ihren Ursprung im myenterischen Plexus hatten. Die Nervenendigungen der myenterischen Neurone zeigten unmittelbare Nachbarschaft zum einen zu den motorischen Endplatten des Sarkolemms der quergestreiften Muskelzellen, zum anderen zu Nervenendigungen der Motoraxone aus dem Ncl. ambiguus, welche durch anterograde Tracings und immunhistochemische Färbung von CGRP als Marker als solche identifiziert wurden. Insgesamt wiesen zwischen 35 % im zervikalen und knapp 78 % der motorischen Endplatten im abdominalen Ösophagus eine solche Koinnervation auf, ohne Unterschied zwischen longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht. In weiteren Untersuchungen konnten sie neben der NO-Synthase auch die Lokalisation des Neuropeptids VIP in den enterischen Nervenendigungen (Neuhuber, W. L. et al. 1994, S.24ff; Worl, J. et al. 1994, S.230-231; Worl, J. et al. 1997, S.114ff) sowie hohe Konzentrationen der löslichen Guanylatzyklase als „intrazellulären Rezeptor“ von NO im

Sarkolemm der quergestreiften Muskulatur besonders in Nähe der motorischen Endplatten nachweisen (Neuhuber, W. L. et al. 2001, S.43). Kuramoto et al. beschrieben auch Galanin-enthaltende Nervenendigungen an den motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur des Rattenösophagus (Kuramoto, H. et al. 1996, S. 188), wobei sich später herausstellte, daß diese mit den VIP/NOS/NADPH-d-positiven Nervenendigungen identisch waren (Kuramoto, H. et al. 1999, S.243-244; Worl, J. et al. 1998, S.455, S.458). Weitere potentielle Transmitter, die neben NOS, VIP und Galanin in den enterischen Nervenendigungen vorkommen, sind Opioide. Zumindest das endogene Opioid Met-Enkephalin konnte kürzlich ebenfalls in den Nervenendigungen dieser Neurone nachgewiesen werden und darüberhinaus eine hohe Dichte des μ -Opioidrezeptors auf dem Sarkolemm der quergestreiften Muskulatur (Neuhuber, W. L. et al. 2001, S.43). Die zumindest histologisch demonstrierte Koinnervation der motorischen Endplatte durch myenterische Neurone, welche in ihren Nervenendigungen NOS, VIP, Galanin und Opioide enthalten, wirft ein neues Licht auf die Rolle des ENS in der Kontrolle der Motilität des Rattenösophagus. Zudem konnte kürzlich anhand elektrophysiologischer Ableitungen demonstriert werden, daß zumindest 1/3 der Neurone des myenterischen Plexus der Ratte eine lebhaft Aktivität in Form von repetitiven Aktionspotentialen zeigen (De Laet, A. et al. 1999, S.257). Auch wenn nach modernem Verständnis die myenterischen Nervenzellen an der direkten Ausführung der Peristaltik keine Rolle zu spielen scheinen, so legen die neueren morphologischen und elektrophysiologischen Daten zumindest eine Modulation der Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur durch das ENS nahe.

4.3.2.2 MASH-1-, „Knockout“-Mäuse

Das ENS des Ösophagus weist entwicklungsgeschichtlich Besonderheiten gegenüber den enterischen Neuronen und Gliazellen des restlichen Gastrointestinaltraktes auf: Während das ENS des Magens und des Intestinums überwiegend von Zellen des vagalen Segments der Neuralleiste abstammt (Somiten 1-5), stammen die meisten enterischen Neurone des Ösophagus, genauso wie die meisten posterioren sympathischen Ganglien und die sympathischen Zellen des Nebennierenmarks, von Zellen des anterioren Rumpfes der Neuralleiste ab (Somiten 6-7) (Durbec, P. L. et al. 1996, S.355-356). Die teilweise unterschiedliche Herkunft der Zellen des ENS des Ösophagus und des übrigen Magen-Darm-Traktes erklärt auch die Beobachtung, daß die regelrechte Migration und Differenzierung der Vorläuferzellen aus der Neuralleiste und somit die Entwicklung der einzelnen Abschnitte des

ENS an das Vorhandensein jeweils verschiedener Wachstumsfaktoren und Rezeptoren gebunden ist. So findet man in sogenannten „Knockout“-Mäusen, bei denen die Gene inaktiviert wurden, welche für den Wachstumsfaktor GDNF (glial-derived neurotrophic factor) oder dessen Rezeptor (c-RET) kodieren, (*gdnf* *-/-*, *Ret* *-/-* Mäuse), eine drastisch reduzierte Anzahl enterischer Neurone im Magen und ein Fehlen von enterischen Neuronen im Gastrointestinaltrakt distal des Magens, aber eine weitgehend regelrechte Entwicklung des ENS im Ösophagus (Durbec, P. L. et al. 1996, S.352). Im Gegensatz dazu weisen Knockout-Mäuse, deren Gen für den sogenannten Transkriptionsfaktor MASH-1 inaktiviert wurde (*MASH-1* *-/-* Mäuse), keine enterischen Neurone im Ösophagus auf. Enterische Neurone sind bei diesen Mäusen im Magen, Dünn- und Dickdarm vorhanden, wenngleich in verminderter Anzahl. Durch das Prinzip der homologen Rekombination können Gene von pluripotenten embryonalen Stammzellen gezielt manipuliert werden. Nach anschließender Injektion der veränderten Zellen in Blastozysten und Überführung in sogenannte Forster-Mäuse, die die genetisch veränderten Tiere austragen, können dann durch Rückkreuzung Knockout-Mäuse generiert werden, in denen beide Allele des entsprechenden Gens inaktiviert sind. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, Modellsysteme zu schaffen, in denen man die Funktion des inaktivierten Gens bzw. des Genprodukts untersuchen kann. Am Beispiel der *MASH-1*- oder der *c-RET*-Knockout-Mäuse konnte man nicht nur die Notwendigkeit verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren für die regelrechte Entwicklung des ENS morphologisch zeigen, sondern man besitzt zugleich auch ein Modellsystem *in vivo*, in dem man auf die Funktion des ENS in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts rückschließen kann. *MASH-1*-Knockout-Mäuse, welche keine enterischen Ganglien im Ösophagus aufweisen, stellen einen neuartigen Ansatz dar, die Funktion und mögliche Beteiligung des ENS an der Motilität des Ösophagus von Säugetieren, deren *Muscularis propria* gänzlich aus quergestreifter Muskulatur besteht, zu erforschen. *MASH-1* *-/-* Mäuse sterben innerhalb von 24 Stunden nach ihrer Geburt ohne daß während ihrer Lebenszeit Muttermilch in den Magen gelangt (Guillemot, F. et al. 1993, S.463; Sang, Q. et al. 1999, S.2). Homozygote *c-RET*- oder auch *GDNF*-Knockout-Mäuse, welche keinerlei enterische Neurone im Gastrointestinaltrakt distal des Magens besitzen, sterben ebenfalls innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt, mit dem Unterschied, daß sie zur regelrechten Aufnahme und zum Weitertransport von Muttermilch in den Magen befähigt sind. Bei ihnen ist lediglich die weitere Progression der Nahrung in den Dünndarm gestört. Ob eine Kausalität zwischen dem Verlust der enterischen Neurone im Ösophagus und dem offensichtlich fehlenden Transport der Muttermilch in den Magen der *MASH-1* *-/-* Mäuse besteht, ist nicht klar. Eine mögliche

Erklärung wäre eine gestörte Peristaltik des Ösophagus durch die oben beschriebene ausbleibende Koinnervation der quergestreiften Muskulatur durch das ENS. Allerdings hat zum Zeitpunkt der Geburt der Mäuse die Transdifferenzierung (siehe 4.4) der Muscularis propria im distalen Drittel der Speiseröhre von glatter in quergestreifter Muskulatur noch nicht vollständig stattgefunden (Patapoutian, A. et al. 1995, S.1818); da also zu diesem Zeitpunkt die Muscularis propria des distalen Ösophagus noch aus glatter Muskulatur besteht, die normalerweise durch intrinsische Neurone des ENS innerviert wird, ist eine fehlende oder gestörte Peristaltik in diesem Abschnitt der Speiseröhre naheliegend. Ein weiterer Grund für das Fehlen von Milch im Magen von MASH-1 ^{-/-} Mäusen könnte aber auch das Fehlen von NOS-haltigen Nervenfasern des ENS im Bereich des UÖS sein (Sang, Q. et al. 1999, S.8), die durch Ausschüttung hauptsächlich von NO für die regelrechte Relaxation des UÖS verantwortlich sind. Ob eine gestörte Peristaltik des Ösophagus bzw. Relaxation des UÖS nun die eigentliche Ursache für die fehlende Muttermilch im Magen ist, ist aber weitgehend spekulativ, da MASH-1-Knockout-Mäuse neben dem Ausbleiben der Ausbildung des ENS im Ösophagus weitere Defekte aufweisen, die mit einer fehlerhaften Nahrungsaufnahme in Zusammenhang stehen könnten. So kommt es infolge der Inaktivierung des Transkriptionsfaktors MASH-1 auch zu einem frühen Untergang neuronaler Vorläuferzellen des olfaktorischen Epithels und einer gestörten Entwicklung des sympathischen Grenzstrangs (Guillemot, F. et al. 1993, S.463). Alleine ein defektes Riechorgan wäre kausal für eine fehlende Nahrungsaufnahme der MASH-1 ^{-/-} Mäuse denkbar. Somit konnten die Untersuchungen an MASH-1-Knockout-Mäusen ebenso nicht eindeutig klären, ob das ENS an der Steuerung der Motilität der Muscularis propria beteiligt ist.

4.3.2.3 Rolle des myenterischen Plexus an der Koordination der Peristaltik bei Spezies mit gemischter Muskulatur in der Muscularis propria

Bei Spezies wie Mensch, Katze und Opossum, deren Muscularis propria aus quergestreifter und glatter Muskulatur besteht, erfolgt die Innervation und Steuerung der Motilität und Peristaltik der quergestreiften Muskulatur im proximalen Drittel des Ösophagus genauso wie bei Spezies mit ausschließlich quergestreifter Muskulatur in der Muscularis propria des gesamten Ösophagus. Doch auch hier ist die funktionelle Rolle myenterischer Neurone zwischen den Schichten der quergestreiften Muskulatur bisher unbekannt, da in diesem Abschnitt des Ösophagus mit quergestreifter Muskulatur die Peristaltik durch übergeordnete

zentrale Strukturen in der Medulla oblongata initiiert und koordiniert wird. Dagegen gestaltet sich die Organisation der Peristaltik in den distalen Ösophagusabschnitten mit glatter Muskulatur in der Muscularis propria unterschiedlich. Während also die Auslösung des Schluckvorgangs und die Progression der peristaltischen Welle im proximalen Drittel des Ösophagus bei Spezies mit gemischter Muskulatur ebenfalls zentral gesteuert wird, so unterliegt die Koordination einer geordneten Peristaltik im Ösophagusabschnitt mit glatter Muskulatur Strukturen im Ösophagus selbst. Dies wird deutlich, wenn man den Stumpf des durchtrennten N. vagus des Opossums in vivo elektrisch stimuliert, was vielmehr in einer progressiven kraniokaudal fortschreitenden Peristaltik als einer simultanen Kontraktion des glatten Muskel-Segments des Ösophagus resultiert (Kravitz, J. J. et al. 1978, S.359; Dodds, W. J. et al. 1978, S.392; Dodds, W. J. et al. 1979, S.561). Der Schluß, daß das „peristaltische Programm“ der glatten Muskulatur peripher lokalisiert ist, wird auch durch die Beobachtungen am Opossum unterstützt, daß nach beidseitiger Vagotomie die schluckinduzierte primäre Peristaltik ausbleibt, aber die durch intraluminale Dehnung ausgelöste sekundäre Peristaltik weiterhin auslösbar ist (Kravitz, J. J. et al. 1978, S.359). Sogar in vitro kann das isolierte glatte Muskel-Segment des Ösophagus peristaltische Kontraktionen generieren, in dem man durch elektrische Feldstimulation die intrinsischen Nerven des ENS in der Ösophaguswand stimuliert oder die Muskelwand mittels eines Ballonkatheters dilatiert (Christensen, J. et al. 1969, S.408).

Das periphere Programm, welches für die Peristaltik der glatten Muskulatur verantwortlich ist, wird hauptsächlich durch das Zusammenspiel cholinerg und nitrerger Neurone des myenterischen Plexus des ENS in der Speiseröhre bestimmt. Die zellulären Mechanismen des ENS, die dieser Peristaltik der glatten Muskulatur zugrundeliegen, sollen im Folgenden kurz erläutert werden, obwohl sie für die erwachsene Ratte nicht zutreffen, aber die unterschiedliche Funktion des ENS in Abschnitten des Ösophagus mit quergestreifter oder glatter Muskulatur deutlich machen. Darüberhinaus spielen diese Mechanismen mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die Peristaltik in der Perinatalperiode von Spezies mit ausschließlich quergestreifter Muskulatur in der Muscularis propria eine Rolle, da in dieser Zeit der Entwicklung die Transdifferenzierung von glatter in quergestreifte Muskulatur noch nicht vollständig geschehen ist (siehe 4.4).

Elektrophysiologisch resultiert das Auslösen eines Schluckvorgangs durch willkürliches Schlucken oder auch durch vagale Stimulation in einer Hyperpolarisation des Membranpotentials der zirkulären Schicht der glatten Muskelzellen entlang des Ösophagus. Dieser Hyperpolarisation folgt eine Depolarisation der Plasmamembran verbunden mit dem

Auftreten von Aktionspotentialen (spike potentials) der glatten Muskelzellen. Während der Phase der Depolarisation kommt es zu einer Kontraktion der zirkulären glatten Muskulatur. Die Progression der Kontraktion der zirkulären Muskulatur in Form einer peristaltischen Welle ist also abhängig von der zeitlichen Abstimmung der Depolarisationsphase an den verschiedenen Höhenlokalisationen des Ösophagus. Das zeitliche Auftreten der Depolarisation der glatten Muskelzellen wiederum wird determiniert durch die Dauer der vorhergehenden Hyperpolarisationsphase (Kannan, M. S. et al. 1985, S.342; Decktor, D. L. et al. 1982, S.301; Conklin, J. L. et al. 1994, S.915). Die Grundlage für diese Erkenntnisse stellten Organbadversuche mit glatten Muskelstreifen des Ösophagus des Opossums in den 70er Jahren dar (Weisbrodt, N. W. et al. 1972, S.1159; Christensen, J. et al. 1979, S.677). Die Gewebestreifen bestanden aus den beiden Schichten der Muscularis propria mit den dazwischenliegenden intrinsischen myenterischen Nerven, wobei die Kraftentwicklung nach transmuraler elektrischer Stimulation je nach Präparation der Muskelstreifen entweder in longitudinaler oder zirkulärer Richtung gemessen wurde. Die selektive niederfrequente (20 Hz) transmurale elektrische Stimulation intrinsischer Nerven resultierte in einer stereotypen Kontraktion der zirkulären glatten Muskulatur: Während der Applikation des Stimulus konnte keine oder nur eine sehr geringe mechanische Muskelantwort durch direkte Stimulation des Muskels gemessen werden. Mit Sistieren des elektrischen Reizes folgte eine kurze Phase der Ruhe bevor eine phasische, etwa 2 s andauernde Kontraktion der zirkulären glatten Muskulatur folgte. Die Zeit nach Beendigung des elektrischen Stimulus bis zum Beginn der Kontraktion der Muskulatur wurde als Latenzperiode (latency period), die Kontraktion selbst als Off-Kontraktion (off contraction, off response) bezeichnet. Die Latenzperiode variierte in ihrer Dauer je nach Höhenlokalisation der entnommenen Muskelstreifen im Ösophagus, wobei sie sich in kраниокаудale Richtung zunehmend verlängerte. Die Latenzperiode ist dabei identisch mit der Dauer der Hyperpolarisation des Membranpotentials der glatten Muskelzellen. Der Gradient in der Latenz des Auftretens der Off-Kontraktion, spiegelt dabei die von kranial nach kaudal fortschreitende peristaltische Welle beim Schluckakt wider. Die Off-Kontraktion ist aber nicht nur durch transmurale Stimulation der intrinsischen Neurone des ENS auslösbar, sondern kann auch nach Applikation vagaler elektrischer oder lokaler mechanischer Stimuli beobachtet werden (Dodds, W. J. et al. 1978, S.E392; Dodds, W. J. et al. 1979, S.E561).

Die intrinsischen Nerven, die die Hyperpolarisation und die anschließende Off-Kontraktion der zirkulären glatten Muskulatur steuern, wurden lange Zeit als non-adrenerge, non-cholinerge Neurone bezeichnet (NANC-Neurone), da der von ihnen ausgeschüttete

Transmitter weder Adrenalin bzw. Noradrenalin noch Acetylcholin ist. Fast 20 Jahre lang wurde nach dem Transmitter der enterischen Nerven gesucht, der diese motorischen Funktionen des Ösophagus vermittelt. Während in den 70er und 80er Jahren CGRP und VIP die Hauptkandidaten waren, haben sich in den letzten 10 Jahren vor allem durch die Entwicklung spezifischer Inhibitoren der NO-Synthase die Hinweise verdichtet, daß der NANC-Transmitter NO oder zumindest eine NO-enthaltende Substanz ist. So konnte in vielen Untersuchungen gezeigt werden, daß die Applikation von NO-Synthase-Inhibitoren nicht nur zu einer Verminderung der Kontraktionsamplitude der Off-Kontraktion, sondern auch zu einer Verkürzung der Latenzperiode führte. Zudem kam es auch zu einer Verminderung und Verkürzung der initialen Hyperpolarisation der zirkulären glatten Muskulatur (Kannan, M. S. et al. 1985, S.344; Du, C. et al. 1991, S.1012; Murray, J. et al. 1991, S.404; Anand, N. et al. 1994, S.126). Applikation von Inhibitoren der NO-Synthase beim Opossum in vivo führt demnach nach Auslösen des Schluckreflexes zu einem beschleunigten Auftreten von Peristaltik, was zu einer fast simultanen Kontraktion der zirkulären Muskulatur in den distalen Abschnitten des Ösophagus führt (Yamato, S. et al. 1992, S.197). Man geht heute davon aus, daß NO die initiale Hyperpolarisationsphase auslöst und steuert und erachtet die darauffolgende Depolarisation der glatten Muskulatur als ein Reboundphänomen auf die vorhergehende Hyperpolarisation.

Inwieweit cholinerge Neurone des ENS an der Steuerung der Peristaltik des Ösophagus eine Rolle spielen ist nicht gänzlich geklärt. Nach hochfrequenter (>20 Hz) transmuraler elektrischer Stimulation werden in vitro auch atropinsensitive On-Kontraktionen beobachtet, also Kontraktionen, die schon während der Stimulation ohne bzw. nur nach kurzer Latenzzeit auftreten und nach L-NNA-Zugabe an Ausmaß zunehmen. Daß diese cholinergen Mechanismen in der Generierung der peristaltischen Kontraktionen von Bedeutung sind, ist durch Untersuchungen in vivo oder durch hochfrequente N. vagus-Stimulation gut belegt (Dodds, W. J. et al. 1978; Dodds, W. J. et al. 1979). Die genannten neueren Untersuchungen weisen aber darauf hin, daß das „Timing“ der Peristaltik v.a. durch nitrerge Neurone des myenterischen Plexus gesteuert wird.

Dieser kurze Exkurs zu Spezies, deren Muscularis propria im distalen Ösophagus aus glatter Muskulatur besteht, macht deutlich, daß bei ihnen das peristaltische Programm in den enterischen Nerven des Ösophagus selbst liegt und wirft erneut die Frage nach der Funktion dieser enterischen Nerven in Spezies mit ausschließlich quergestreifter Muskulatur in der Muscularis propria auf.

4.3.2.4 Submuköser Plexus und Muscularis mucosae

Die Lamina muscularis mucosae (Tunica muscularis mucosae, TMM) ist eine relativ kräftig ausgeprägte longitudinale Schicht glatter Muskelzellen an der Grenze zur Submukosa (siehe 4.1). Die Muscularis mucosae formt dabei quasi einen inneren muskulären Schlauch, der sich entlang des gesamten Ösophagus erstreckt. Während man die viel stärker ausgebildete Muscularis propria als eigentliche „treibende Kraft“ peristaltischer Kontraktionen des Ösophagus erachtet, ist die funktionelle Rolle der TMM weitgehend unbekannt. Ob die TMM nur zu lokalisierten Bewegungen der Mukosa befähigt ist oder die Muscularis propria in der Generierung propulsiver Motilität der Wand des Ösophagus aktiv unterstützt, ist unklar. Aber gerade bei Spezies, deren Muscularis propria ausschließlich quergestreifte Muskulatur enthält, ist es durchaus vorstellbar, daß die glatte Muskulatur der TMM ähnliche motorische Funktionen besitzt, wie die glatte Muskulatur der Muscularis propria von Spezies, die quergestreifte und glatte Muskulatur in der Muscularis propria aufweisen. Für diese These sprechen:

- a) die TMM wird reichlich durch intrinsische Neurone des ENS innerviert, die wiederum Projektionen von extrinsischen Nervenfasern des N. vagus erhalten (siehe 4.3.1). Immunhistochemische Befunde konnten die Existenz einer Vielzahl verschiedener putativer Transmitter des ENS nicht nur in den Neuronen des myenterischen, sondern auch des submukösen Plexus der Ratte und des Meerschweins belegen; inter alia VIP, Substanz P, Somatostatin, Opioide und NO-Synthase (Schultzberg, M. et al. 1980, S.723-728; Worl, J. et al. 1994, S.231);
- b) neben der exzitatorischen Innervation durch cholinerge Nervenfasern des N. vagus und des ENS, konnte gezeigt werden, daß die TMM auch über eine inhibitorische Innervation durch enterische Nervenfasern verfügt, was als Voraussetzung für die Generierung peristaltischer Kontraktionen glatter Muskulatur erachtet wird. So führt die elektrische transmurale Feldstimulation präkontrahierter TMM-Streifen nach Blockade der exzitatorischen cholinergen Übertragung zu einer größtenteils TTX-sensitiven Relaxationsantwort der TMM (Bieger, D. et al. 1985, S.98; Akbarali, H. I. et al. 1986, S.52; Will, S. et al. 1990, S.2420). Die chemische Natur dieser Relaxationsantwort ist nicht sicher geklärt. Als Transmitter, welche die inhibitorische Innervation der TMM vermitteln kommen v.a. in Frage: CGRP, VIP, 5-Hydroxytryptamin, Katecholamine,

Opioide und NO (Kamikawa, Y. et al. 1982, S.273; Kamikawa, Y. et al. 1983a, S.103; Kamikawa, Y. et al. 1983b, S.695; Bieger, D. et al. 1985, S.93; Akbarali, H. I. et al. 1986, S.56, S.61; Will, S. et al. 1990, S.2420; Moumami, C. et al. 1992, S.42);

- c) die TMM ist in der Lage, intraluminalen Druck zu entwickeln (Bieger, D. et al. 1985, S. 95);
- d) die TMM weist einen proximo-distalen Gradienten in ihrer Perzeption gegenüber intrinsischer neuraler und exogener chemischer Stimuli auf (Bieger, D. et al. 1985, S.97, S.102).

Obwohl die TMM in der Generierung der Peristaltik gegenüber der Muscularis propria eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, so sprechen gerade die beschriebene komplexe intrinsische und extrinsische Innervation und die Fähigkeit der TMM, intraluminalen Druck aufzubauen, dafür, daß die TMM alle Voraussetzungen erfüllt, aktiv an der Peristaltik des Ösophagus teilzunehmen.

4.4 Entwicklung und Besonderheiten der quergestreiften Muskulatur des Ösophagus

Das Mesoderm ist das mittlere der drei Keimblätter, das sich ab dem Stadium der dreiblättrigen Keimscheibe (ca. 17. Tag) komplex differenziert und sich zu Skelett, Bindegewebe, Muskulatur, Urogenitaltrakt, Milz, Blutgefäßen, Blutzellen u.a. Strukturen entwickelt. In Embryonen von Säugetieren sind quergestreifte Skelettmuskulatur und glatte Muskulatur distinkte Gewebe, die eine unterschiedliche Funktion, Innervation und Struktur aufweisen und sich im Regelfall aus unterschiedlichen Abschnitten des Mesoderms entwickeln. So besteht der Skelettmuskel aus fusionierten multinukleären Myotuben und weist lichtmikroskopisch eine charakteristische Querstreifung auf; die glatte Muskulatur dagegen besteht aus mononukleären Zellen ohne Querstreifung. Erst kürzlich gelang es nachzuweisen, daß die quergestreifte Muskulatur des Ösophagus zumindest der Maus sich überraschenderweise nicht aus Myoblasten und Myotuben entwickelt, sondern im Rahmen eines Transdifferenzierungsprozesses aus bereits differenzierter glatter Muskulatur entsteht. Diese Transdifferenzierung von glatter in quergestreifte Muskulatur beginnt in der späten Embryonalzeit (16. Tag der Embryonalzeit, E 16) und dauert bis in die frühe Postnatalperiode (8. Tag der Postnatalperiode, P 8). Dabei beginnt dieser Vorgang am rostralen Ende des

Ösophagus und schreitet nach kaudal fort, so daß zum Zeitpunkt der Geburt die Muscularis propria des distalen Ösophagus noch aus phänotypisch glatter Muskulatur besteht (Patapoutian, A. et al. 1995, S.1819; Sang, Q. et al. 1997, S.119). Obwohl es einige Muskelgene gibt, die sowohl in glatter als auch in quergestreifter Muskulatur exprimiert werden, sind andere wiederum hochspezifisch. Im Laufe der Entwicklung ändert die hochdifferenzierte glatte Muskulatur des Ösophagus ihr genetisches Programm und es kommt zu einem Rückgang der Expressierung solcher hochspezifischer Marker für glatte Muskulatur (z.B. MLCK= smooth myosin light chain) mit einer parallel ansteigenden Expressierung hochspezifischer Gene für quergestreifte Muskulatur (z.B. MCH= skeletal fast myosin heavy chain oder auch α -Actinin). Dabei zeigt sich, daß gleichzeitig Marker der glatten und der quergestreiften Muskulatur in ein und derselben Zelle exprimiert werden, was darauf hindeutet, daß es sich bei diesem Prozess um das seltene Phänomen der programmierten direkten Transdifferenzierung handelt und nicht um eine Differenzierung der quergestreiften Muskulatur aus einer Population von Vorläuferzellen, die nie den Phänotyp glatter Muskelzellen angenommen hätte (Patapoutian, A. et al. 1995, S.1818; Kablar, B. et al. 2000, S.1627). Obwohl zu dem Zeitpunkt, an dem die Muscularis propria phänotypisch noch glatte Muskulatur ist, bereits cholinerge motorische Nervenendigungen aus dem Ncl. ambiguus in der Muscularis propria präsent sind, entwickeln sich die für Skelettmuskulatur typischen nikotinergen Rezeptoren und damit motorische Endplatten erst mit dem Transdifferenzierungsprozeß in quergestreifte Muskulatur (Sang, Q. et al. 1997, S.119). Die Vermutung, daß die enterischen Ganglien des myenterischen Plexus an der regelrechten Transdifferenzierung der Muskulatur beteiligt sind, konnten Untersuchungen an MASH-1-Knockout-Mäusen, bei denen eine Entwicklung des ENS im Ösophagus ausbleibt (siehe 4.3.2.2), nicht bestätigen, da bei ihnen der Transdifferenzierungsprozeß normal verläuft (Sang, Q. et al. 1999, S.3).

Die Transdifferenzierung der Muscularis propria von glatter in quergestreifte Muskulatur ist bisher nur an der Maus gut belegt, doch es bestehen kaum Zweifel, daß dieses Phänomen ein physiologisch programmierter Schritt der Entwicklung der quergestreiften Muskulatur des Ösophagus auch bei der Ratte und anderen Säugetieren ist. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind demnach die intrinsischen Nerven des myenterischen Plexus an der Steuerung der Peristaltik der Muscularis propria vor vollendeter Transdifferenzierung und Ausbildung motorischer Endplatten beteiligt, so daß die Möglichkeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei den enterischen Neuronen zwischen den Schichten der

quergestreiften Muskulatur der adulten Ratte um einen funktionslosen Überrest aus embryonalen und neonatalen Tagen handeln könnte.

5. Spezielle Diskussion

5.1 Charakterisierung der Versuchsmodelle

5.1.1 Charakterisierung des Systems und der Kontraktionsantwort nach TES mittels TTX, Atropin, Tubocurarin und Pancuronium

Die nach transmuraler Applikation von elektrischen Einzelimpulsen im Abstand von 10 s beobachteten Einzelkontraktionen („twitches“) der Muskelstreifen konnten aufgrund ihres „ruckartigen“ Auftretens und der anschließenden Charakterisierung durch pharmakologische Substanzen der quergestreiften Muscularis propria zugeordnet werden. Da sehr niedrige Stimulationsparameter gewählt wurden (20 V; 0,2 ms Impulsdauer; 0,1 Hz), ist eine Beteiligung der glatten Muscularis mucosae an der beobachteten Kontraktionsantwort sehr unwahrscheinlich; zudem würde man nach transmuraler Stimulation unter höheren Stimulationsparametern eher eine phasische, langsame Kontraktionsantwort der Muscularis mucosae erwarten, die im Vergleich zur beobachteten Kontraktionsantwort gänzlich anders aussähe (Bieger, D. et al. 1985, S.96). Erwartungsgemäß zeigte der muskarinerge Antagonist Atropin auch keine Wirkung auf die so ausgelöste Stimulationsantwort.

Die beiden nikotinergen Blocker der neuromuskulären Übertragung an der motorischen Endplatte quergestreifter Muskulatur Tubocurarin und Pancuronium führten zu einer signifikanten, wenngleich aber nicht kompletten Inhibition der beobachteten Kontraktionsantwort. Die Beobachtung, daß dabei Pancuronium in äquimolarer Konzentration zu einer stärkeren Hemmung der Muskelkontraktion führte als Tubocurarin, ist vereinbar mit Untersuchungen in denen sich herausstellte, daß Pancuronium bei der Ratte (im Gegensatz zu anderen Spezies, wie auch dem Mensch) eine höhere relative Potenz gegenüber Tubocurarin besitzt (Buckett, W. R. et al. 1968, S.671; Derkx, F. H. et al. 1971, S.106). Obwohl TTX in der Neurophysiologie eine gängige pharmakologische Substanz zum Nachweis neuronaler Übertragung ist, da sie die Erregungsfortleitung neuronaler Strukturen durch selektive Blockade spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle hemmt ohne dabei die Permeabilität für K⁺-Ionen zu beeinflussen, muß man in dem vorliegenden Versuchsaufbau davon ausgehen, daß die beobachtete Kontraktionsantwort zum überwiegenden Teil nicht neuronal vermittelt ist, sondern einer direkten Stimulation der quergestreiften Muskulatur unterliegt. Neben dem neuronalen Rezeptor-Subtyp (n-Typ) des Na⁺-Kanals, der auf neuronalen Geweben lokalisiert

ist, besitzt nämlich auch die Skelettmuskulatur einen Rezeptor-Subtyp (m-Typ), der eine sehr hohe Affinität gegenüber TTX aufweist. Im Gegensatz dazu bedarf es der Blockade der glatten Muskulatur, des denervierten Skelettmuskels und des Herzmuskels (h-Typ) sehr hoher Konzentrationen von TTX. So sind zur Blockade des Na^+ -Stroms in Nerv und Skelettmuskel etwa 1 bis 10 nmol/l, im Herzmuskel und auch in der glatten Muskulatur dagegen Konzentrationen von 1 bis 30 mmol/l TTX notwendig (Moczydlowski, E. et al. 1986, S.5321 ff). In diesem Kontext ist auch die beobachtete komplette Inhibition der Kontraktionsantwort nach TES nach Applikation von TTX zu verstehen, obwohl die beiden Inhibitoren der motorischen Endplatte nur zu einer teilweisen Hemmung der Muskelantwort führten, da TTX auch den nicht-neuronal vermittelten Anteil der Kontraktion durch Blockade der m-Typ-Kanäle auf der quergestreiften Muskulatur blockte. Daß nach transmuraler Stimulation die Kontraktion der quergestreiften Muskulatur nicht nur neuronal vermittelt ist, sondern zu einem bedeutenden Teil durch direkte Depolarisation der Muskelmembran zustande kommt, bestätigen auch Untersuchungen an der Speiseröhre des Meerschweins, in denen Tubourarin ebenfalls nur eine inkomplette Inhibition der quergestreiften Muskulatur bewirkte (Kerr, K. P. et al. 1995a, S.217).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die TES von Muskelstreifen des Rattenösophagus unter den verwendeten Stimulationsparametern in einer Kontraktion der quergestreiften Muscularis propria resultiert, wobei aber >50 % dieser Kontraktionsantwort durch eine direkte Stimulation der Muskulatur ausgelöst wird. Obwohl die transmurale Stimulation in einigen Fragestellungen zur Koinnervation der quergestreiften Muskulatur durch das ENS wünschenswert wäre, da durch sie auch intrinsische Nerven erregt werden, ist dieser Versuchsansatz aufgrund der direkten Stimulation der quergestreiften Muskulatur nur von eingeschränktem Aussagewert. TTX ist als pharmakologisches Werkzeug zum Nachweis neuronaler Übertragung in Geweben mit quergestreifter Muskulatur nur eingeschränkt einzusetzen.

5.1.2 Charakterisierung des Systems und der Kontraktionsantwort nach ENVS mittels verschiedener pharmakologischer Substanzen

Durch eine vagale Stimulation im Abstand von mindestens 1,5 cm von der Muskulatur des Ösophagus wurde eine direkte Stimulation der quergestreiften Muskulatur vermieden. Dies

belegen u.a. die Versuche, in denen nach Vagotomie keine Muskelkontraktionen nach ENVS mehr registriert werden konnten.

ENVS (40 V, 0,5 ms) unter verschiedenen Frequenzen resultierte in einer biphasischen Kontraktionsantwort, wobei die beiden beobachteten Komponenten der Muskelantwort durch jeweils unterschiedliche neuronale Transmissionsmechanismen vermittelt wurden. Eine ähnliche Vagus-Ösophagus-Präparation wurde 1987 von Beveridge et al. erstmals am Meerschwein beschrieben (Beveridge, A. A. et al. 1987, S.205ff). Im Gegensatz zu vorliegendem Modell bestand das Präparat nur aus den distalen 3 cm des Ösophagus des Meerschweins ohne Asservation der beiden Nn. recurrentes. Für die Ratte ist vorliegender Versuchsaufbau bisher nicht beschrieben. Lediglich Bieger et al. haben einen vergleichbaren Versuchsaufbau zur Untersuchung der Muscularis mucosae der Ratte bisher angewendet (Bieger, D. et al. 1985, S.94): Ihre Präparation bestand entweder aus dem proximalen oder distalen Abschnitt des Rattenösophagus, wobei jeweils nur der linke *oder* der rechte N. vagus zur elektrischen Stimulation verwendet wurde. Dabei wurde der Ösophagus im Organbad kurariniert, um die „störenden“ Kontraktionen der quergestreiften Muskulatur zur besseren Untersuchung der glatten Muscularis mucosae zu beseitigen. Beveridge et al. erhielten nach ENVS am Ösophagus des Meerschweins ebenfalls eine biphasische Kontraktionsantwort (Beveridge, A. A. et al. 1987, S.208), dagegen beschrieben Kerr et al. in 57 % der untersuchten Fälle eine triphasische Kontraktionsantwort (Kerr, K. P. et al. 1995a, S.215), die sie auf die retrograde Stimulation afferenter Neurone zurückführten, die wiederum durch die Freisetzung von Substanz P cholinerge Neurone in der Muscularis mucosae erregen. Diese triphasische Kontraktionsantwort erscheint aber instabil, da dieselbe Arbeitsgruppe noch in demselben Jahr in einer weiteren Veröffentlichung nur eine biphasische Kontraktionsantwort beschrieb (Kerr, K. P. et al. 1995b, S.1003), ohne auf ihre früheren Erkenntnisse hinzuweisen. Im vorliegenden Modell konnte eine solche dritte Komponente in der Kontraktionsantwort nach elektrischer Stimulation der N. vagus jedenfalls nicht beobachtet werden, wobei Speziesunterschiede oder ein unterschiedlicher Modellaufbau für dieses widersprüchliche Resultat ebenfalls denkbar sind.

Wie bereits erwähnt, lagen den beiden Komponenten der biphasischen Kontraktionsantwort unterschiedliche neuronale Transmissionsmechanismen zugrunde. Die erste Komponente, welche im niedrigen Frequenzbereich (1-10 Hz) aus „twitch“-Kontraktionen bestand und im höheren Frequenzbereich (20-50 Hz) eine für Skelettmuskulatur typische tetanische Kontraktionsantwort zeigte, war durch Tubocurarin schon in relativ geringen Dosen (10^{-5} M) komplett hemmbar. Dagegen zeigten weder der Ganglienblocker Hexamethonium noch

Atropin einen signifikanten Effekt auf den ersten Teil der Kontraktionsantwort. Diese Resultate belegen die Hypothese, daß die erste Komponente der Stimulationsantwort die Kontraktion quergestreifter Muskulatur der Muscularis propria repräsentiert, die aus einer Stimulation somatomotorischer cholinergischer vagaler Nervenfasern resultiert, welche ohne synaptische Verschaltung via motorischer Endplatten die Muscularis propria innervieren. Hexamethonium, das seine Hauptwirkung über die Blockierung des unspezifischen Kationenkanals vorwiegend ganglionärer nikotinerger Ach-Rezeptoren entfaltet, besitzt in hohen Konzentrationen auch eine gewisse Affinität für nikotinerge Ach-Rezeptoren des Skelettmuskels und für muskarinerge Rezeptoren auf glatter Muskulatur (Leung, E. et al. 1982, S.11; Kerr, K. P. et al. 1995b, S.1004). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen des Ganglienblockers (10^{-4} M) schließen aber eine solche unspezifische Wirkung weitgehend aus. Die Beobachtung, daß Ganglienblockade keinen unmittelbaren Einfluß auf die Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur ausübt, deckt sich mit Ergebnissen von Untersuchungen anderer Autoren am Ösophagus der Ratte und des Meerschweins, wie bereits unter 4.3.2.1 erwähnt (Bartlet, A. L. 1968, S.171-172; Gruber, H. 1978a, S.172; Kerr, K. P. et al. 1995a, S.216). Die zweite Komponente der Kontraktionsantwort nach vagaler Stimulation war gegenüber Tubocurarin unempfindlich, konnte jedoch sowohl durch Ganglienblockade mit Hexamethonium als auch durch Atropin gehemmt werden; dies zeigt, daß es sich bei dieser Komponente der Kontraktionsantwort um glatte Muskulatur, also der Muscularis mucosae handeln muß, und daß ENVS in einer Stimulation präganglionärer vagaler cholinergischer Nervenfasern resultiert, die via ganglionärer Verschaltung postganglionäre cholinerge Neurone erregen, welche die glatte Muskulatur innervieren. Dies spiegelt auch die heutige Auffassung über die extrinsische Innervation der Muscularis mucosae des Rattenösophagus wider (siehe 4.3.1). Die Höhe der Amplitude der glatten Muskelantwort im Vergleich zur quergestreiften Muskelantwort betrug erstaunlicherweise bis zu 20 % und ist ein Indikator dafür, daß die TMM wohl in der Lage ist, die Muscularis propria aktiv an der Peristaltik zu unterstützen.

Insgesamt kann durch dieses in dieser Form neuartige Versuchsmodell die extrinsische Innervation der Muscularis propria und der Muscularis mucosae der Ratte demonstriert werden, wobei die Kurvenverläufe eine genaue Diskriminierung zwischen quergestreifter und glatter Muskelantwort zulassen. Die Ergebnisse belegen zudem die komplette neurale Aktivierung nach ENVS und schließen eine direkte Muskelstimulation aus.

5.2 Einfluß möglicher Transmitter des ENS auf die Kontraktionsantwort nach ENVS und TES

Ob in dem vorliegenden Versuchsaufbau durch die vagale Stimulation neben den intrinsischen cholinergen Neuronen, welche die TMM versorgen, auch andere Neurone des ENS erregt werden, ist fraglich. So wurde durch exogene Zugabe möglicher Neurotransmitter intrinsischer Neurone, welche zum einen unmittelbare Nachbarschaft zur motorischen Endplatte der quergestreiften Muskulatur zeigen, zum anderen auch in den Neuronen des submukösen Plexus vorkommen, getestet, ob diese Transmitter in der Lage sind, die Kontraktibilität der quergestreiften Muscularis propria und der glatten TMM zu beeinflussen.

5.2.1 Galanin

Galanin ist ein 29-Aminosäuren-Peptid, welches im zentralen und peripheren Nervensystem sowie im Gastrointestinaltrakt der meisten Säugetiere weit verbreitet ist (Ekblad, E. et al. 1985b, S.355). Die physiologischen Funktionen dieses Peptids im Gastrointestinaltrakt sind jedoch abhängig von Spezies und Gewebe. So sind sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Wirkungen von Galanin auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes von Säugetieren beschrieben. Galanin bewirkt am Ileum der Ratte, des Meerschweins, des Hasen und des Schweins eine Kontraktion der longitudinalen glatten Muskulatur (Ekblad, E. et al. 1985a, S.243; Botella, A. et al. 1995, S.3; Ahtaridis, S. A. et al. 1998, S.308), wogegen die glatte Muskulatur des Ileums des Hundes oder die glatte Muskulatur des Magens des Meerschweins auf Galanin mit einer Relaxation oder einer Kontraktion reagiert (Gu, Z. F. et al. 1994, S.1427; Botella, A. et al. 1995, S.3). Obwohl Galanin immunhistochemisch in den intrinsischen Neuronen des Ösophagus vieler Spezies, wie auch beim Menschen, bereits nachgewiesen wurde (Singaram, C. et al. 1994, S.1690; Lichtenstein, G. R. et al. 1994, S.213; Kuramoto, H. et al. 1996, S.188) fehlen weitgehend funktionelle Daten, inwiefern Galanin die Kontraktibilität des Ösophagus beeinflusst. Lediglich leichte exzitatorische Effekte an der glatten Muskulatur des Hühnerösophagus sind beschrieben (DeGolier, T. F. et al. 1999, S.465).

In vorliegendem Modellsystem zeigte die exogene Zugabe von Galanin oder dessen spezifischen Rezeptorantagonisten Galanin 1-15 trotz der morphologischen Koinnervation der Muscularis propria durch galaninerge intrinsische Neurone (siehe 4.3.2.1) keinen signifikanten

Effekt auf die Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur der Muscularis propria. Dagegen erwies sich Galanin als potenter Inhibitor der Kontraktionsantwort der glatten TMM nach vagaler Stimulation, ein Effekt, der durch Galanin 1-15 auch signifikant reversibel war. Der Basaltonus des Gewebes änderte sich durch die Zugabe von Galanin nicht. Seine exzitatorische Wirkung am glatten Muskel des Jejunums der Ratte entfaltet Galanin über die Aktivierung eines spezifischen Galaninrezeptors, gekoppelt an ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein, was zu einem erhöhten Einstrom von extrazellulärem Ca^{++} führt und konsekutiv die MLC-Kinase (myosin light chain kinase; Myosinkinase) aktiviert, was zu einer erhöhten Myosin-Leichte-Ketten-Phosphorylierung und damit zu einer Kraftentwicklung der glatten Muskulatur führt (Ahtaridis, S. A. et al. 1998, S.312). Die relaxierende Wirkung von Galanin an der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes basiert auf verschiedenen Mechanismen. Eine Relaxation der glatten Muskulatur kann Folge sein einer direkten Interaktion von Galanin mit verschiedenen spezifischen Galaninrezeptoren auf dem Zielgewebe, was zu einer erniedrigten intrazellulären Ca^{++} -Konzentration führt, entweder durch eine direkte Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{++} -Kanäle oder indirekt über die Öffnung ATP-sensitiver K^{+} -Kanäle oder die Aktivierung der Adenylatzyklase (Gu, Z. F. et al. 1994, S.1427-1429). Neben diesen direkten Wirkungen auf die glatte Muskulatur besitzt Galanin aber auch Eigenschaften eines Neuromodulators, der präsynaptisch die Ach-Freisetzung cholinergischer Neurone des ENS hemmen kann (Akehira, K. et al. 1995, S. 149). Eine Aussage über den genauen Wirkungsort von Galanin kann in vorliegendem Modell nicht gemacht werden. Während der Nachweis einer funktionellen Bedeutung der morphologischen Koinnervation der quergestreiften Muskulatur durch galaninerge Neurone der ENS noch weiterhin ausbleibt, deuten die Ergebnisse darauf hin, daß Galanin als inhibitorischer Transmitter an der Regulation der Motilität der Muscularis mucosae beteiligt sein könnte.

5.2.2 VIP

VIP wurde 1970 von Said und Mutt entdeckt, als sie Darm- und Lungenextrakte nach Substanzen mit vasodilatatorischen Eigenschaften untersuchten (Said, S. I. et al. 1970a, S.1217; Said, S. I. et al. 1970b, S.863). Im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren ist das 28-Aminosäurenpeptid in Nervenzellen und Nervenfasern des myenterischen und submukösen Plexus in nahezu allen Abschnitten enthalten (Schultzberg, M. et al. 1980, S.724) und gilt heute neben v.a. NO und den Purinen als ein wichtiger inhibitorischer NANC-Transmitter des

ENS. VIP relaxiert verschiedene Typen vaskulärer und nicht-vaskulärer glatter Muskulatur und ist ein potenter Stimulus intestinaler und pankreatischer Elektrolytsekretion (Dockray, G. J. 1994, S.183). Seinen relaxierenden Effekt auf die glatte Muskulatur in vielen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes bewirkt VIP sekundär durch die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel. Im oberen Gastrointestinaltrakt ist VIP an der rezeptiven Relaxation des Magenfundus und der Relaxation des UÖS beteiligt (Dockray, G. J. 1994, S.184; Conklin, J. L. et al. 1994, S.921; Uc, A. et al. 1999, S.548). Die Rolle VIP-enthaltender Neurone des myenterischen und submukösen Plexus an der Motilität des Ösophagus ist dagegen unklar und nur wenig untersucht. Lediglich Akbarali et al. demonstrierten einen relaxierenden Effekt von VIP auf präkontrahierte isolierte longitudinale TMM-Streifen des Rattenösophagus (Akbarali, H. I. et al. 1986, S.56). Zur Auswirkung von VIP auf die Kontraktionskraft der quergestreiften Muscularis propria liegen dagegen keine Daten vor.

Obwohl die anatomische Koinnervation der quergestreiften Muskulatur durch VIP-erge Neurone des myenterischen Plexus eine Modulation der Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur nahelegt, konnte kein Effekt von VIP oder dessen spezifischen Rezeptorantagonisten VIP 10-28 auf die Kontraktionsamplitude der quergestreiften Muskulatur nach ENVS demonstriert werden. Dagegen kam es zu einer signifikanten Verminderung der Kontraktionsantwort der glatten Muskulatur, welche nach Zugabe von VIP 10-28 signifikant reversibel war. Während es an vorliegendem Modell genauso wenig wie für Galanin gelang, eine funktionelle Bedeutung von VIP in den Nervenfasern myenterischer Neurone, welche die Muscularis propria koinnervieren, nachzuweisen, konnte erstmals gezeigt werden, daß es sich bei der relaxierenden Wirkung von VIP auf die glatte Muskulatur um einen spezifischen, über einen VIP-Rezeptor vermittelten Effekt handelt. Ob VIP auch in vivo tatsächlich aus enterischen Neuronen freigesetzt wird und die Kontraktilität der TMM des Ösophagus moduliert, bedarf weiterer Untersuchungen. Da es nach alleiniger Zugabe des spezifischen VIP-Antagonisten zu keiner Alteration der Kontraktionsamplitude der glatten Muskulatur nach vagaler Stimulation kam, muß man aber davon ausgehen, daß es zumindest unter den verwendeten Stimulationsparametern in vorliegendem Modell zu keiner endogenen VIP-Freisetzung kommt, welche die Kontraktilität der TMM beeinflusst.

5.2.3 L-NNA, L-Arginin, ODO und DEA-NO

Die funktionelle Bedeutung von NO als NANC-Transmitter des ENS verschiedener Spezies ist seit der Entwicklung spezifischer Inhibitoren der NO-Synthase bereits an vielen Abschnitten des GI-Traktes etabliert. So fungiert NO u.a. als inhibitorischer Transmitter an verschiedenen Sphinkterregionen (De, Man JG et al. 1991, S.1092; Uc, A. et al. 1999, S.G548) und ist maßgeblich beteiligt an der adaptiven Relaxation des Magens (Boeckstaens, G. E. et al. 1991, S.441) und der deszendierenden Inhibition des peristaltischen Reflexes (Hata, F. et al. 1990, S.1400).

NO wird im Körper in der Gegenwart von O_2 und NADPH von der Aminosäure L-Arginin unter der Bildung von L-Citrullin abgespalten. Diese Reaktion wird von dem Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert, von der drei Haupt-Isoformen bekannt sind: neuronale NOS (nNOS, Typ I), endotheliale NOS (eNOS, Typ III) und induzierbare NOS (iNOS, Typ II). Die neuronale NOS wird hauptsächlich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert, konnte aber auch in anderen Geweben wie Skelettmuskel, Macula densa und Plazenta nachgewiesen werden. Ebenso wie die endotheliale NOS, die vorwiegend in vaskulären Endothelzellen lokalisiert ist, wird die neuronale nNOS Ca^{++} /Calmodulin-abhängig aktiviert. Während diese beiden Formen konstitutiv exprimiert werden, wird die induzierbare NOS durch Induktionsstimuli wie Endotoxine und Zytokine in verschiedenen Zellen, darunter Makrophagen, Kardiomyozyten und Mikroglia, Ca^{++} -unabhängig de novo synthetisiert (Mayer, B. et al. 1998, S.127).

Anders als die „klassischen Neurotransmitter“ diffundiert NO leicht durch biologische Membranen und kann auch nicht in Vesikeln gespeichert werden. Dabei entfaltet NO seine inhibitorische Wirkung auf die glatte Muskulatur der Gefäße oder des GI-Traktes nicht über Zellmembranrezeptoren, sondern bindet an die Häm-Gruppe der löslichen Form der Guanylatzyklase. Dieser intrazelluläre „Enzymrezeptor“ bildet aus GTP den sekundären Messenger cGMP. In glatten Muskelzellen aktiviert cGMP die cGMP-abhängige Proteinkinase G, die schließlich spezifische Zielproteine phosphoryliert und dadurch die cytoplasmatische Ca^{++} -Konzentration senkt und die Muskelzellen zur Erschlaffung bringt. Neben der Aktivierung der Proteinkinase G vermag cGMP seine Wirkung aber auch über Regulierung anderer Effektorproteine, wie Phosphodiesterasen oder cGMP-gesteuerter Ionenkanal-Proteinkinasen zu vermitteln (Mayer, B. et al. 1998, S.111). Außer der direkten inhibitorischen Wirkung auf die glatte Muskulatur besitzt NO auch Eigenschaften eines

Neuromodulators, indem es z.B. die Ach-Freisetzung aus Neuronen entweder verstärkt oder inhibiert (Kilbinger, H. et al. 1992, S.44; Smith, T. K. et al. 1998, S.896ff).

Um den Einfluß des NO-cGMP-Signaltransduktionsweges auf die Kontraktionskraft der quergestreiften und glatten Muskulatur nach vagaler Stimulation und damit eine evtl. Bedeutung der nitrergen Koinnervation zu untersuchen, wurden in vorliegender Arbeit neben exogenem NO in Form von DEA-NO (Feelisch, M. 1998, S.119) Substanzen verwendet, die an unterschiedlichen Angriffspunkten die NO-Signaltransduktion blockieren. Im einzelnen waren dies N^ω-Nitro-L-Arginin (L-NNA) und ¹H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ). Der NO-Synthase-Inhibitor L-NNA verhindert die Synthese von NO, indem es mit L-Arginin als natürliches Substrat kompetitiv um das katalytische Zentrum v.a. der konstitutiven Isoformen der NO-Synthase konkurriert und eine Abspaltung von NO verhindert; diese Wirkung läßt sich durch die Zugabe von L-Arginin im Überschuss gut antagonisieren, wodurch L-NNA wiederum kompetitiv am katalytischen Zentrum verdrängt wird (Mayer, B. et al. 1998, S.129). ODQ ist ein spezifischer Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase als intrazellulärer „NO-Rezeptor“ und verhindert so die Aktivierung cGMP-gesteuerter Zielproteine und Proteinkinasen (Lohse, M. J. et al. 1998, S.112).

L-NNA bewirkte eine nicht signifikante Zunahme der Kontraktionsamplitude der quergestreiften Muskulatur sowohl nach TES als auch nach ENVs. Auch ODQ, L-Arginin und DEA-NO führten zu keiner signifikanten Änderung der Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur nach ENVs bzw. TES unter den verwendeten Stimulationsparametern, vereinbar mit Ergebnissen von De Laet et al., die ebensowenig einen Einfluß des NO-cGMP-Signaltransduktionsweges nach TES von quergestreiften Muskelstreifen des Rattenösophagus demonstrieren konnten (De Laet, A. et al. 1999, S. 257). So gelang es in vorliegendem Modell trotz eindeutiger morphologischer Hinweise nicht, eine funktionelle Bedeutung von NO in der Modulation der Kontraktionskraft der longitudinalen Muscularis propria nachzuweisen.

L-NNA, ODQ oder L-Arginin zeigten auch keinen Effekt auf die Kontraktionsamplitude der TMM nach ENVs, dagegen führte die exogene Zugabe von DEA-NO zu einer starken Inhibition der glatten Muskulatur. Daß weder L-NNA noch ODQ die Kontraktilität der TMM nach ENVs beeinflussten, spricht dafür, daß es in Ruhe bzw. unter den verwendeten Stimulationsparametern in vorliegendem Setup nicht zu einer endogenen NO-Freisetzung aus enterischen Neuronen kommt, die einen inhibitorischen Einfluß auf die glatte Muskulatur der TMM ausübt. Eine Aussage ob, bzw. unter welchen Bedingungen NO and der Steuerung der Peristaltik der glatten Muskulatur der TMM beteiligt ist, war in dem verwendeten

Versuchsaufbau nicht zu machen. Die Beobachtung der inhibitorischen Wirkung von exogenem NO nach ENVS ist aber durchaus vereinbar mit Ergebnissen von Will et al., die an isolierten präkontrahierten TMM-Streifen zeigen konnten, daß nach Blockade der exzitatorischen cholinergen Übertragung TES zu einer überwiegend TTX-sensitiven Relaxationsantwort führt, die durch L-Arginin verstärkt und durch N⁰-Methyl-L-Arginin (L-NMA), einem unspezifischen Inhibitor der NOS, teilweise geblockt wurde (Will, S. et al. 1990, S.2420). Dies spricht dafür, daß zumindest unter bestimmten Bedingungen eine endogene NO-Freisetzung aus enterischen Neuronen möglich ist, die eine inhibitorische Wirkung auf die TMM ausübt.

5.2.4 Serotonin

Nachdem schon seit Anfang des Jahrhunderts bekannt war, daß beim Zerfall von Thrombozyten eine blutdrucksenkende Substanz im Serum auftritt, gelang es der Arbeitsgruppe von Rapport, Green und Page im Jahre 1948 aus 210 Litern Rinderserum wenige Milligramm einer kristallinen Substanz zu gewinnen. Die Autoren nannten sie nach ihrer Herkunft und der damals bekannten Hauptwirkung Serotonin. Die chemische Struktur dieser heute als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) bezeichneten Substanz wurde in wesentlichen Zügen schon damals aufgeklärt. Ein von diesem Forschungsansatz unabhängiger Weg wurde seit den 30er Jahren von der Arbeitsgruppe von Erspamer in Untersuchungen der enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts beschritten. Diese Autoren wiesen einen darmstimulierenden Faktor nach, den sie Enteramin nannten und dessen Identität mit 5-HT 1952 erkannt wurde (Erspamer, V. et al. 1966).

Die 5-HT-Rezeptorfamilie wurde zunächst in vier gut charakterisierte pharmakologische Subpopulationen, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ und 5-HT₄ klassifiziert (Humphrey, P. P. et al. 1993, S.233). In molekularen Untersuchungen konnten weitere Subtypen des 5-HT-Rezeptors kloniert werden (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆, 5-HT₇), deren funktionelles Korrelat aber noch unklar ist. Während die Rolle von 5-HT an der Initiierung peristaltischer und sekretorischer Reflexe des Darms durch Stimulierung mucosaler Fortsätze intrinsischer (via 5-HT_{1P} bzw. 5-HT₄) und extrinsischer (via 5-HT₃) primär afferenter Neurone gut belegt ist (Gershon, M. D. 2000, S.114), so ist eine Bedeutung von 5-HT an der Regulation der Motilität der Speiseröhre unklar, zumal der Ösophagus beachtliche Spezies-Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen 5-HT-Rezeptorsubpopulationen aufweist. Während endogenes 5-HT im GI-

Trakt von Säugetieren hauptsächlich in den mukosalen enterochromaffinen Zellen in hoher Konzentration nachweisbar ist, findet man 5-HT auch in den intrinsischen enterischen Neuronen, wo sie als Neurotransmitter fungieren. An isolierten Muskelstreifen der TMM des Ösophagus konnten bisher sowohl stimulierende als auch inhibitorische Effekte von 5-HT demonstriert werden. Die TMM des Meerschweins und des Kaninchens reagiert auf exogenes 5-HT mit einer Kontraktionsantwort via Stimulation von 5-HT₂-Rezeptoren auf cholinergen Neuronen des submukösen Plexus (Kamikawa, Y. et al. 1983a, S.106; Cohen, M. L. et al. 1994, S.145). Dagegen sind die Daten der Wirkung von 5-HT auf die TMM des Rattenösophagus kontrovers: Bieger et al. demonstrierten im proximalen Ösophagus einen inhibitorischen Effekt auf mit Carbachol prästimulierte TMM-Streifen, zugleich aber auch eine leichte exzitatorische Wirkung auf den Basaltonus von TMM-Streifen des distalen Ösophagusabschnitts. Die exzitatorische Kontraktionsantwort konnte dabei durch den 5-HT₂-Rezeptorantagonisten Ketanserin zuverlässig geblockt werden, wohingegen die inhibitorische Antwort durch keinen der damals bekannten 5-HT-Rezeptorantagonisten reversibel war (Bieger, D. et al. 1985, S.99, S.100). Heute ist durch die Verfügbarkeit hochspezifischer 5-HT-Rezeptorantagonisten bekannt, daß die 5-HT-vermittelte Relaxationsantwort sowohl mit Carbachol als auch mit Substanz P präkontrahierter TMM-Streifen des Rattenösophagus via postsynaptischer 5-HT₄-Rezeptoren vermittelt wird (Waikar, M. V. et al. 1993, S.656; Yang, D. C. et al. 1993, S.1342; Goldhill, J. et al. 1997, S.231), wobei die Aktivierung der 5-HT₄-Rezeptoren dabei mit einer Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel einhergeht (Moumami, C. et al. 1992, S.49). Dabei muß erwähnt werden, daß im Gegensatz zum Ösophagus die Aktivierung von 5-HT₄-Rezeptoren im übrigen GIT im Allgemeinen mit einer Aktivierung cholinerg myenterischer Neurone einhergeht (Kilbinger, H. et al. 1992, S.272; Woollard, D. J. et al. 1994, S.455). Untersuchungen zur Wirkung von 5-HT auf die Kontraktionskraft der quergestreiften Muskulatur des Ösophagus existieren nicht.

5-HT hatte in vorliegender Versuchsanordnung keinen Einfluß auf den Basaltonus der Muskulatur. Auch konnte kein Effekt auf die Kontraktionsamplitude der quergestreiften Muskulatur nach ENVS beobachtet werden. Dagegen erwies sich 5-HT als äußerst potenter Inhibitor der Kontraktionsantwort der TMM, was gut vereinbar ist mit der derzeitigen Vorstellung, daß 5-HT via Aktivierung postsynaptischer 5-HT₄-Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen zu einer von Ach unabhängigen direkten Relaxation führt. Dieser Wirkmechanismus wurde mittels spezifischer Antagonisten und Untersuchungen an präkontrahierter TMM nicht näher verifiziert, da dies durch vorhergehende Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bereits gut belegt ist (s.o.) und nicht Hauptgegenstand vorliegender

Studie war. Eine exzitatorische Wirkung von 5-HT auf das Kontraktionsniveau der TMM konnte in dem verwendeten Versuchsaufbau weder nach ENVS noch unter Basalbedingungen beobachtet werden, wie von Bieger für die TMM des distalen Rattenösophagus gezeigt (Bieger, D. et al. 1985, S.99, S.100). Diese widersprüchlichen Beobachtungen sind derzeit nicht erklärbar, zumal auch neuere Untersuchungen gegen einen stimulierenden Effekt von 5-HT auf die TMM des Rattenösophagus sprechen (Cohen, M. L. et al. 1994, S.145). Insgesamt scheint aber aufgrund der Existenz von 5-HT in den intrinsischen Neuronen des ENS des Ösophagus sowie der hier gezeigten inhibitorischen Wirkung von 5-HT auf die Kontraktibilität der TMM, daß 5-HT an der Regulation der Motilität der TMM beteiligt sein könnte.

5.2.5 Opiode

Seit wann die Menschheit das Opium kennt, ist nicht sicher. Doch man weiß, daß bereits im 3. Jahrtausend v. Chr. der Schlafmohn von den Sumerern im Zweistromland zwischen Tigris und Euphrat zur Opiumgewinnung kultiviert wurde. Anfang des 19. Jh konnte aus dem Opium erstmals das Morphin als erstes Alkaloid und wichtigster Wirkstoff des Opiums isoliert werden. Auch der tierische Organismus enthält endogenes, aus L-Tyrosin biosynthetisiertes Morphin, dessen physiologische Bedeutung jedoch unklar ist. Dagegen sind endogene Opioidpeptide im Organismus weit verbreitet und an der Steuerung verschiedener Körperfunktionen beteiligt (Illes, P. et al. 1996, S.207). Die Isolierung und chemische Charakterisierung der ersten Vertreter dieser Substanzklasse gelang Hughes et al. 1975, die sie nach ihrer Herkunft aus dem Gehirn Enkephaline nannten (Hughes, J. et al. 1975, S.578). Mittlerweile kennt man neben den Enkephalinen eine Reihe weiterer solcher endogener Opioidpeptide, u.a. die Dynorphine, die Endorphine, die Neo-Endorphine, Endomorphine und das Nociceptin. Die endogenen Opiode zeichnen sich dadurch aus, daß sie genauso wie die Opiatalkaloide ihre physiologische Wirkung über sogenannte Opioidrezeptoren vermitteln. Nach der neuen Nomenklatur werden die verschiedenen Opioidrezeptoren numeriert (Opioidrezeptoren 1-4; OP₁₋₄), die alte Nomenklatur nach Martin et al. 1976, in denen die Rezeptoren nach den Anfangsbuchstaben der in ihren Studien verwendeten agonistischen Substanzen benannt wurden (so z.B. μ für Morphin oder κ für Ketocyclacozin) ist aber auch in der neuen Literatur noch sehr geläufig (OP₁ = δ -Rezeptor, OP₂ = κ -Rezeptor, OP₃ = μ -Rezeptor, OP₄ = ORL₁-Rezeptor, opioid receptor-like 1) (Dhawan, B. N. et al. 1996, S.570).

Die natürlichen Liganden des δ -Rezeptors sind die Enkephaline, des κ -Rezeptors die Dynorphine, des μ -Rezeptors die Endorphine und Endomorphine und des ORL_1 -Rezeptors das Nociceptin, wobei hinzuzufügen ist, daß meist keine strenge Spezifität der Liganden besteht.

Von der motilitätshemmenden und antisekretorischen Eigenschaft der Opiate weiß man schon seit Jahrhunderten. Derivate der Opiate werden noch heute zur symptomatischen Therapie von Durchfallerkrankungen eingesetzt. Die endogenen Opioide bzw. ihre Rezeptoren sind im Gastrointestinaltrakt weit verbreitet. So finden sich die Opioidvorstufen Proenkephalin und Prodynorphin, aber auch β -Endorphin in den enterischen Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus mit unterschiedlicher Häufigkeitsverteilung abhängig von Lokalisation und Spezies entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes (Schultzberg, M. et al. 1980, S.724), wobei Daten zu den erst kürzlich entdeckten natürlichen Liganden des μ -Rezeptors, den Endomorphinen (Julius, D. 1997, S.442), bislang fehlen. Generell können Opioide die Motilität des Gastrointestinaltraktes zum einen durch direkte Interaktion mit der glatten Muskulatur beeinflussen, was im Allgemeinen in einer exzitatorischen Antwort der Muskulatur resultiert (Dockray, G. J. 1994, S.188); zum anderen können sie präsynaptisch die Tranmitterfreisetzung exzitatorischer (Ach, Substanz P) oder inhibitorischer Transmitter (VIP, NO) modulieren (Nishiwaki, H. et al. 2000, S.83; Yokotani, K. et al. 1998, S.93).

In vorliegender Studie konnte eine signifikante inhibitorische Wirkung der hochspezifischen μ -Agonisten Endomorphin-1 und -2 auf die quergestreifte und glatte Muskulatur nach ENVS demonstriert werden, die sowohl nach Zugabe von Naloxon als auch des spezifischeren μ -Rezeptorantagonisten CTAP signifikant reversibel war. Die alleinige Zugabe der beiden Antagonisten hatte keinen Effekt auf die Kontraktionsantworten der Muscularis propria oder der TMM, so daß man davon ausgehen muß, daß es unter den verwendeten Stimulationsparametern in diesem Modell zu keiner Freisetzung von Opioiden kommt, die die Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur via μ -Rezeptoren beeinflussen. Da es sich bei Endomorphin-1 und -2 bzw. CTAP um hochspezifische μ -Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten handelt, ist der beobachtete Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Aktivierung von μ -Rezeptoren zurückzuführen; neben den Endomorphinen kommen allerdings auch andere endogene Opioidpeptide, insbesondere die Enkephaline, deren Existenz in den Nervenendigungen der myenterischen Neurone des Rattenösophagus, die die quergestreifte Muskulatur histologisch koinnervieren, bereits belegt ist, in Frage, die in vivo eine Modulation der Kontraktilität des Ösophagus via μ -Rezeptoren vermitteln. Neue

immunhistochemische Studien, in denen eine hohe Dichte von μ -Rezeptoren direkt auf dem Sarkolemm der quergestreiften Muskulatur des Rattenösophagus gezeigt wurde (Neuhuber, W. L. et al. 2001, S.43) deuten darauf hin, daß der beobachtete inhibitorische Effekt eher durch eine direkte inhibitorische Wirkung auf die Kontraktilität der Muscularis propria als durch eine Modulation der Ach-Freisetzung via präsynaptischer μ -Rezeptoren vermittelt wird, ein Mechanismus der zumindest an myenterischen Neuronen sowohl des Rattenmagens als auch des Ileums des Meerschweins gut belegt ist (Yokotani, K. et al. 1998, S.93; Nishiwaki, H. et al. 2000, S.83; Tonini, M. et al. 1998, S.687).

Die inhibitorische Wirkung von Opiaten auf die Motilität der TMM des Ösophagus war bereits Gegenstand der Diskussion in den 80er Jahren. Bieger et al. zeigten, daß Morphin nach ENVS und TES zu einer Naloxon-sensitiven Inhibition der Muskelkontraktion der TMM des Rattenösophagus führt. Da die Kontraktionen nach vagaler Stimulation empfindlicher gegenüber Morphin waren als nach elektrischer Feldstimulation, welche hauptsächlich zur Erregung postganglionärer Neurone führt, schlossen sie daraus, daß vagale präganglionäre Neurone der Hauptangriffsort der Opiat-vermittelten Inhibition sind. Bemerkenswert war zudem die Beobachtung, daß die TMM einen von oral nach aboral ansteigenden Gradienten in ihrer Sensitivität gegenüber Morphin aufwies (Bieger, D. et al. 1985, S.102, S.104). Da in dem vorliegenden Modell keine Unterscheidung zwischen proximaler und distaler TMM möglich ist, könnte demzufolge die beobachtete „Restkontraktion“ der TMM von ca. 20 % nach Zugabe von Endomorphin-2 die Kontraktion der proximalen TMM repräsentieren. Inhibitorische Wirkungen von Opioiden sind auch an der TMM des Ösophagus des Meerschweins beschrieben. Kamikawa et al. konnten dies für die Enkephaline, die Dynorphine und die Endorphine nach TES von TMM-Plexus submucosus-Präparationen zeigen. Da die endogenen Opioide keinen Einfluß auf mit Ach präkontrahierte TMM-Muskelstreifen hatten, hielten sie eine direkte hemmende Interaktion der Opioide mit der glatten Muskulatur für unwahrscheinlich und folgerten, daß die inhibitorische Opioidwirkung durch Modulation postganglionärer cholinergischer Neurone via κ -Rezeptoren erfolgt (Kamikawa, Y. et al. 1983b, S.697). In unserem Versuchsaufbau konnte zwar ein signifikanter inhibitorischer Effekt des spezifischen κ -Agonisten U-69593 auf die ENVS-induzierte Kontraktion der TMM beobachtet werden, dieser Effekt konnte aber weder durch den spezifischen κ -Antagonisten nor-Binaltorphimin noch durch den relativ unselektiven Opioidrezeptorantagonisten Naloxon antagonisiert werden, weshalb eine unspezifische Wirkung von U-69593 nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem zeigte die Zugabe von nor-Binaltorphimin alleine keine Wirkung auf beide Kontraktionsantworten. Weder der selektive δ -

Agonist SNC 80 noch der spezifische δ -Antagonist Naltrindol änderten die Kontraktionsamplituden der quergestreiften und glatten Muskulatur, so daß der δ -Rezeptor an der Regulation der Kontraktionskraft der Muscularis propria und TMM durch Opioide nicht involviert zu sein scheint. Eine Aussage über einen Einfluß von Opioiden auf das „Timing“ der peristaltischen Kontraktionen kann anhand des gewählten Versuchsaufbaus nicht gemacht werden. So ist belegt, daß die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur des Ileums der Ratte im Rahmen des ascendierenden peristaltischen Reflexes via μ - und κ -Rezeptoren reguliert werden kann, während Stimulation von δ -Rezeptoren und μ -Rezeptoren die Latenzzeit zwischen elektrischem Stimulus und Auftreten der Kontraktion verlängern kann (Allescher, H. D. et al. 2000, S.62).

Eine Beweis für eine Wirkung von Agonisten bzw. Antagonisten des κ - und δ -Rezeptors auf die Kontraktionskraft der quergestreiften Muskulatur konnte nicht erbracht werden. Dagegen ist der inhibitorische Effekt von Endomorphin-1 und -2 auf die quergestreifte Muscularis propria der erste Hinweis überhaupt, daß endogene Opioide, die in den Nervenendigungen myenterischer Neurone vorkommen, für die bis dato nur morphologische Befunde für eine Koinnervation der quergestreiften Muskulatur existieren, die Kontraktionskraft der Muscularis propria modulieren können und daß somit die Existenz von myenterischen Ganglien zwischen den Schichten der quergestreiften Muskulatur eine funktionelle Bedeutung hat.

Gegen Ende 1995 konnten gleichzeitig zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander den endogenen Liganden des ORL₁-Rezeptors (OP₄) identifizieren. Die französischen Untersucher um Meunier nannten das Heptadekapeptid Nociceptin (Meunier, J. C. et al. 1995, S.532), die Untersucher aus der Schweiz um Reinscheid nannten es Orphanin FQ (Reinscheid, R. K. et al. 1995, S.792). Mittlerweile hat sich herauskristallisiert, daß neben den klassischen Opioidrezeptoren auch der ORL₁-Rezeptor im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren exprimiert wird (Wang, J. B. et al. 1994, S.77), doch über dessen physiologische Funktion ist erst wenig bekannt. Wie auch die bisher bekannten endogenen Opioide hemmt Nociceptin in vitro neurogen vermittelte Kontraktionen von Magen und Dünndarm vieler Spezies, darunter Ratte (Yazdani, A. et al. 1999, S.108), Meerschwein (Zhang, G. et al. 1997, S.102) und Schwein (Osinski, M. A. et al. 1999, S.281). Der inhibitorische Effekt von Nociceptin ist dabei nicht antagonistisch mittels Naloxon und es erscheint, daß zumindest bei der Ratte eine verminderte Ach-Freisetzung für diese Wirkung ursächlich ist (Yazdani, A. et al. 1999, S.108). Auf der anderen Seite besitzt Nociceptin bei der Ratte auch exzitatorische Wirkungen

auf die glatte Muskulatur des Kolons (Rizzi, A. et al. 1999, S.3; Yazdani, A. et al. 1999, S.108). Untersuchungen zur Wirkung von Nociceptin auf die quergestreifte oder glatte Muskulatur des Ösophagus existieren nicht.

Nociceptin hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Kontraktionskraft der quergestreiften Muskulatur nach vagaler Stimulation, führte jedoch zu einer signifikanten Inhibition der Kontraktionsantwort der TMM. Daß der beobachtete Effekt durch Naloxon nicht antagonisierbar war, spricht für eine inhibitorische Wirkung von Nociceptin via ORL_1 -Rezeptor, doch mangels spezifischer Antagonisten zum Zeitpunkt der Untersuchungen ist der letzte Beweis dafür noch nicht erbracht. In Anlehnung an die bisherigen Untersuchungen im übrigen Gastrointestinaltrakt zum Mechanismus, der für die relaxierende Wirkung von Nociceptin verantwortlich ist, ist eine Modulation der Transmitterfreisetzung cholinergischer Neurone sicherlich möglich, aber rein spekulativ.

5.3 Einfluß der nikotinergen Agonisten DMPP und Epibatidin auf die Kontraktionsantwort nach ENVS

Die beiden Agonisten ganglionärer nikotinergischer Ach-Rezeptoren DMPP und Epibatidin wurden in der Absicht getestet, neben der elektrisch induzierten Stimulation extrinsischer Neurone pharmakologisch auch intrinsische Nerven des ENS zu stimulieren und auf diesem Wege eine mögliche Interaktion zu untersuchen. DMPP (1,1-Dimethyl-4-phenylpiperazinium) wurde in den 50iger Jahren erstmals von Chen, Portman und Wickel untersucht, die neben der blutdrucksteigernden Wirkung *in vivo* durch Stimulation sympathischer Ganglien und Freisetzung von Katecholaminen aus der Nebennierenrinde auch exzitatorische Effekte auf die glatte Muskulatur des Meerschweinchenileums via Stimulation enterischer Ganglien beschrieben. Diese Effekte waren durch den Ganglienblocker Hexamethonium zuverlässig reversibel (Chen, G. et al. 1954, S.330).

Die nikotinergischen Ach-Rezeptoren werden in Rezeptoren vom Muskeltyp und vom neuronalen Typ eingeteilt und weisen Unterschiede hinsichtlich Zusammensetzung aus Untereinheiten, pharmakologischem Profil und Gewebsverteilung auf. Derzeit kennt man 17 Untereinheiten der Genfamilie der Ach-Rezeptoren von Vertebraten: α_1 - α_9 , β_1 - β_5 , γ , δ , ϵ (Elsevier Trends Journal 1999, S.7). Die meisten α -Untereinheiten stellen die Hauptbindungsstelle für Ach dar, wobei aber die Strukturuntereinheiten ebenso zur Bindungsspezifität beitragen. Alle

nikotinerger Ach-Rezeptoren sind Pentamere, wobei jede Untereinheit vier transmembranäre Domänen besitzt. Die Bindungsstelle für Ach besteht aus wenigstens drei „Peptidschlaufen“ (loops) auf der α -Untereinheit als Hauptkomponente (principle component) sowie drei Loops auf der daneben liegenden Strukturuntereinheit als Nebenkomponekte (complementary component). Es gibt embryonale ($\alpha 1\beta 1\gamma\delta$) und adulte ($\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$) Formen der Ach-Rezeptoren vom Muskeltyp; ob ähnliche entwicklungsbedingte Veränderungen auch für die neuronalen Ach-Rezeptoren zutreffen ist unklar. Viele Subtypen der neuronalen Ach-Rezeptoren setzen sich aus Kombinationen der bekannten Untereinheiten zusammen. Obwohl die genaue Zusammensetzung der meisten Subtypen noch unklar ist, kennt man einige vorherrschende Subtypen in verschiedenen Geweben. So sind die nikotinerger Ach-Rezeptoren der autonomen und sensorischen Ganglien des ENS, die die ganglionäre Neurotransmission vermitteln, vorwiegend aus $\alpha 3$ Untereinheiten in Kombination mit $\beta 4$ oder $\beta 4$ und $\alpha 5$ Untereinheiten aufgebaut. (Elsevier Trends Journal 1999, S.7,8).

Nomenklatur	Muskeltyp (α -Bgt-sensitiv)	Neuronal (α -Bgt-sensitiv)	Neuronal (α -Bgt-insensitiv)	Andere (α -Bgt-sensitiv)
Untereinheiten	$\alpha 1, \beta 1, \gamma, \delta, \epsilon$	$\alpha 7, \alpha 8$	$\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \beta 2, \beta 3, \beta 4$	$\alpha 9$
Ach-Bindungsstelle	$\alpha 1/\gamma$ or $\alpha 1/\epsilon$ & $\alpha 1/\delta$	$\alpha 7/\alpha 7, \alpha 7/\alpha 8, \alpha 8/\alpha 8$	$\alpha 2/\beta 2, \alpha 2/\beta 4, \alpha 3/\beta 2$ $\alpha 3/\beta 4, \alpha 4/\beta 2, \alpha 4/\beta 4$ $\alpha 6/\beta 2, \alpha 6/\beta 4$	$\alpha 9/\alpha 9$
überwiegendes Vorkommen	quergestreifte M, präsynaptisch	ZNS, Retina	autonome Ganglien sensorische Ganglien ZNS/Zerebellum/Retina	Haarzellen der Cochlea

Tabelle 8: Klassifizierung, Zusammensetzung und grobes Verteilungsmuster der Subtypen des nikotinerger Ach-Rezeptors. α -Bgt= α -Bungarotoxin.

Man erachtet DMPP heute primär als einen ganglionären Agonisten neuronaler Subklassen des nikotinerger Ach-Rezeptors (Boyd, R. T. 1997, S.299). Die meisten ganglionären Agonisten wie Nikotin oder Tetramethylammonium zeigen in höheren Dosen oder nach wiederholter Applikation kleiner Dosen auch blockierende Eigenschaften der ganglionären

Neurotransmission. Im Gegensatz dazu scheinen die blockierenden Eigenschaften von DMPP allenfalls gering (Ling, H. W. 1959, S.510), weshalb DMPP auch weit verbreitete Anwendung als pharmakologisches Werkzeug zur Stimulation enterischer Ganglien in verschiedenen experimentellen Versuchsmodellen fand (Ling, H. W. 1959, S.507; Borjesson, L. et al. 1997, S.223; Sotirov, E. S. et al. 1998, S.331). Nach ENVS hatte DMPP in einer Konzentration von 10^{-5} M keinen Einfluß auf die Stärke der Kontraktilität der beiden Kontraktionsantworten, führte aber in der zur ganglionären Stimulation üblichen Konzentration von 10^{-4} M sowohl zu einer starken Inhibition der Kontraktionsantwort der quergesteiften als auch der glatten Muskulatur. Anders als z.B. im Duodenum oder distalen Colon der Ratte, wo DMPP via ganglionärer Stimulation und konsekutiver NO-Freisetzung zu einer Relaxation präkontrahierter Muskelstreifen (Borjesson, L. et al. 1997, S.225f) bzw. einer Inhibition der durch EFS induzierten Kontraktionsantwort (Sotirov, E. S. et al. 1998, S.333) führt, konnte an vorliegendem Modell eine Abhängigkeit der Inhibition der beiden Muskelantworten vom NO-cGMP-Signaltransduktionsweg nicht demonstriert werden, da eine Präinkubation mit L-NNA zu keiner signifikanten Änderung der beobachteten DMPP-induzierten Inhibition führte.

Obwohl eine Modulation der Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur über Freisetzung inhibitorischer Transmitter des ENS nach pharmakologischer ganglionärer Stimulation möglich erscheint, ist hier eine Interaktion von DMPP an muskulären nikotinergen Ach-Rezeptoren der motorischen Endplatte wahrscheinlich, da eine Präinkubation mit Hexamethonium, was natürlich über Ganglienblockade zu einer Hemmung der glatten Muskelantwort führte, ebenfalls zu keiner Änderung der DMPP-vermittelten Inhibition der quergestreiften Muskulatur führte. So gibt es Hinweise, daß DMPP in hohen Konzentrationen seine Selektivität für ganglionäre nikotinerge Ach-Rezeptoren verliert und via Erregung muskulärer nikotinerner Ach-Rezeptoren der motorischen Endplatte ähnlich den depolarisierenden Muskelrelaxantien zu einer Dauerdepolarisation mit daraus resultierendem Depolarisationsblock der quergestreiften Muskulatur führt (Ling, H. W. 1959, S.508; Singh, S. et al. 1998, S.453).

Im Gegensatz zu DMPP vermag Epibatidin neuronale nikotinerge Ach-Rezeptoren bereits in Konzentrationen im niedrigen Nanomolarbereich zu aktivieren und besitzt gegenüber den Ach-Rezeptoren vom muskulären Typ nur eine vergleichsweise geringe Affinität (Gerzanich, V. et al. 1995, S.781). Epibatidin ist ein dem Acetylcholin und Nikotin strukturell verwandtes Alkaloid, welches aus Hautextrakten des ecuadorianischen Giffrosches *Epipetobates tricolor* gewonnen wird und gilt als der bisher potenteste beschriebene Agonist neuronaler nikotinischer Ach-Rezeptoren (Qian, C. et al. 1993, S.R13). Epibatidin zeigt in

Rezeptorbindungsstudien eine im Vergleich mit Nikotin mehr als 100-fach höhere Affinität für v.a. den $\alpha 3, \beta 4$ -Subtyp neuronaler nikotinerger Ach-Rezeptoren, welcher vorwiegend auf synaptischen ganglionären Strukturen des vegetativen und enterischen Nervensystems sowie im ZNS lokalisiert ist (Lloyd, G. K. et al. 1998, S.1603). Das Alkaloid zeichnet sich in vivo zudem durch seine außerordentlich, im Vergleich mit Morphin 200-fache, starke analgetische Potenz aus. Durch Freisetzung von Dopamin und Norepinephrin aus Strukturen des ZNS führt die Applikation von Epibatidin zu einer stark herabgesetzten Schmerzwahrnehmung bei Ratten; der therapeutische Einsatz von Epibatidin als Analgetikum wird aber allerdings limitiert durch unerwünschte Effekte durch Erregung des vegetativen Nervensystems (Boyce, S. et al. 2000, S.443). Die Applikation von Epibatidin (10^{-10} M- 10^{-7} M) führte nach vagaler Stimulation im Gegensatz zu DMPP zu keiner signifikanten Änderung der Kontraktionsamplitude der quergestreiften Muskulatur, was zum einen dafür spricht, daß Epibatidin anders als DMPP die Signalübertragung an der motorischen Endplatte nicht beeinflusst; zum anderen aber deutet der fehlende Einfluß von Epibatidin auf die Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur daraufhin, vorausgesetzt enterische Neurone werden tatsächlich durch den nikotinerger Agonisten stimuliert, daß die enterische Koinnervation der quergestreiften Muskulatur keine direkte funktionelle Bedeutung hinsichtlich der Modulation der Kontraktilität der Muscularis propria hat. Allerdings kann eine Summation exzitatorischer und inhibitorischer Einflüsse durch Erregung enterischer Neurone, was in einer nicht signifikanten Änderung der Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur resultieren könnte, nicht gänzlich ausgeschlossen werden, so daß eine definitive Aussage über eine funktionelle Bedeutung der anatomisch beobachteten Koinnervation nicht gemacht werden kann. Nach Zugabe von Epibatidin ließ sich aber wie nach DMPP-Zugabe eine Abnahme der Kontraktionsamplitude der glatten Muskelantwort nach ENVS beobachten, die ebenso nach vorheriger L-NNA-Präinkubation unverändert auszulösen war, so daß es sich bei der beobachteten Inhibition der Kontraktionsantwort der glatten Muskulatur um einen NO-unabhängigen Mechanismus handeln muß. Da weder DMPP noch Epibatidin einen Einfluß auf den Muskeltonus von mit Carbachol präkontrahierten Muskelstreifen hatte, ist ein direkter Einfluß auf die glatte Muskulatur unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten hemmenden Effekt von DMPP bzw. Epibatidin auf die glatte Muskulatur nach ENVS wäre eine von NO unabhängige inhibitorische Innervation durch enterische Neurone mit bis dato unbekanntem inhibitorischen Transmitter (VIP, Galanin, Serotonin, Opioide u.a.), die durch Zugabe der nikotinerger Agonisten freigesetzt werden und das Kontraktionsniveau der glatten Muskulatur direkt oder durch Modulation der

Transmitterfreisetzung cholinergenter enterischer Neurone beeinflussen. Da aber DMPP und Epibatidin eventuell auch die ganglionäre Übertragung der extrinsischen vagalen Neurone beeinflussen, indem sie mit dem „natürlichen“ Acetylcholin, welches nach ENVS freigesetzt wird, um die nikotineren Rezeptoren auf den postsynaptischen Neuronen, die die Muscularis mucosae innervieren, quasi „konkurrieren“ bzw. einen Depolarisationsblock bewirken, ist eine Deutung der Ergebnisse spekulativ. Weiteren Aufschluss über die beobachtete Inhibition könnten zum einen weitere Versuche nach Präinkubation spezifischer Antagonisten der vermuteten inhibitorischen Transmitter vor Zugabe der nikotineren Agonisten erbringen, zum anderen könnte ein anderer Versuchsaufbau mit transmuraler Stimulation isolierter TMM-Streifen, wonach vornehmlich postsynaptische Neurone stimuliert werden, zeigen, ob DMPP bzw. Epibatidin auch danach noch zu einer Inhibition der glatten Muskulatur führen.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche funktionelle Bedeutung intrinsischer Neurone des enterischen Nervensystems (ENS), welche neben extrinsischen vagalen Neuronen die Muskulatur des Rattenösophagus koinnervieren, an der Steuerung der Motilität des Rattenösophagus zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurde der Einfluß von transmuraler elektrischer Stimulation (TES) und N. vagus-Stimulation (ENVS) auf die Kontraktilität der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus charakterisiert und der Einfluß möglicher Neurotransmitter des ENS und anderer pharmakologischer Stimuli auf die so induzierten Kontraktionsantworten untersucht. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- a) TES von Muskelstreifen des Rattenösophagus unter den verwendeten Stimulationsparametern führt zu einer Kontraktionsantwort der quergestreiften Muscularis propria, die nur zu maximal 40 % neural vermittelt ist.
- b) ENVS führt zu einer biphasischen Kontraktionsantwort. Die erste Komponente der biphasischen Kontraktionsantwort repräsentiert die Kontraktion der quergestreiften Muskulatur der Muscularis propria und resultiert aus einer Stimulation somatomotorischer cholinergischer Neurone des N. vagus, welche ohne ganglionäre Verschaltung die quergestreifte Muskulatur via motorischer Endplatten innervieren. Die zweite Komponente stellt die Kontraktion der glatten Muskulatur der Tunica muscularis mucosae (TMM) dar und resultiert aus einer Stimulation präganglionärer vagaler cholinergischer Nervenfasern, die via ganglionärer Verschaltung postganglionäre cholinerge Neurone erregen, welche die TMM innervieren.
- c) Die möglichen Neurotransmitter des enterischen Nervensystems Galanin, VIP und Serotonin zeigten nach ENVS keinen signifikanten Einfluß auf die Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur, führten aber zu einer Inhibition der Kontraktionsamplitude der TMM. Dabei war die durch Galanin bzw. VIP erzielte Inhibition der glatten Muskulatur durch die beiden spezifischen Antagonisten Galanin 1-15 und VIP 10-28 reversibel. Galanin 1-15 und VIP 10-28 alleine zeigten keinen signifikanten Effekt auf die biphasische Kontraktionsantwort.
- d) Die exogene Zugabe von NO in Form von DEA-NO hatte keinen Einfluß auf die Kontraktionskraft der quergestreiften Muskulatur nach ENVS, führte aber zu einer

Inhibition der glatten Muskulatur. Der NO-Synthaseinhibitor L-NNA und der Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase ODQ beeinflussten die Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur weder nach TES noch nach ENVS und hatten auch keinen signifikanten Effekt auf die Kontraktionsamplitude der TMM nach ENVS.

- e) Die beiden hochspezifischen μ -Rezeptoragonisten Endomorphin-1 und Endomorphin-2 führten zu einer signifikanten Inhibition der Kontraktilität sowohl der quergestreiften als auch der glatten Muskulatur nach ENVS, ein Effekt, der durch Naloxon und den spezifischen μ -Rezeptorantagonisten CTAP reversibel war. Dagegen zeigte der spezifische κ -Rezeptoragonist U-69593 nach ENVS eine inhibitorische Wirkung lediglich auf die Kontraktionsantwort der glatten Muskulatur, wobei dieser Effekt durch den κ -Rezeptorantagonisten Binaltorphimin nicht reversibel war. Der δ -Rezeptoragonist SNC 80 hatte keinen Einfluß auf die biphasische Kontraktionsantwort nach ENVS. Nociceptin als endogener Ligand am ORL_1 -Rezeptor führte zu einer Inhibition der Kontraktionsamplitude der glatten Muskulatur ohne Einfluß auf die Kontraktilität der quergestreiften Muskulatur.
- f) Die beiden ganglionären nikotinerger Agonisten DMPP und Epibatidin führten zu einer Hemmung der Kontraktionsamplitude der glatten Muskulatur. Die Kontraktionsantwort der quergestreiften Muskulatur wurde durch DMPP inhibiert; Epibatidin hatte keinen Einfluß auf die quergestreifte Muskulatur. Die beobachteten Effekte blieben unbeeinflusst durch Präinkubation mit L-NNA.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen, daß sich das neu etablierte Versuchsmodell (ENVs) mit isolierter Ösophagus-Vagus-Präparation gut zur Untersuchung der extrinsischen Innervation der quergestreiften Muscularis propria und der glattmuskulären TMM des Rattenösophagus eignet. Dabei ist es gelungen, in *einem* Modell die Kontraktilität sowohl quergestreifter als auch glatter Muskulatur zu beurteilen. Zur Untersuchung der Innervation und Kontraktilität quergestreifter Muskulatur eignet sich dagegen die TES nur bedingt.

Hinweise für ein funktionelles Korrelat der morphologischen Koinnervation der quergestreiften Muskulatur der Muscularis propria durch NOS/VIP/Galanin/Opioid-haltige myenterische Neurone erbrachten die Versuche mit Endomorphin-1 und -2, die eine Modulation der extrinsischen Innervation durch endogene Opiode via μ -Rezeptoren auf der quergestreiften Muskulatur nahelegen.

Als inhibitorische Neurotransmitter des ENS, welche die Kontraktilität der glattmuskulären TMM neben der exzitatorischen cholinergen vagalen Innervation beeinflussen, kommen v.a.

NO, Galanin, VIP und Serotonin, sowie endogene Opiode, die via μ -Rezeptoren oder ORL₁-Rezeptoren wirken, in Frage.

7. Literaturverzeichnis

1. **Ahtaridis, S. A., Katoch, S. S. und Moreland, R. S.:** Mechanism of galanin-induced contraction of longitudinal smooth muscle of the rat jejunum. *Am.J.Physiol.* 274, 1998: G306-G313
2. **Akbarali, H. I., Bieger, D. und Triggle, C. R.:** Tetrodotoxin-sensitive and -insensitive relaxations in the rat oesophageal tunica muscularis mucosae. *J.Physiol.Lond.* 381, 1986: 49-63
3. **Akehira, K., Nakane, Y., Hioki, K. und Taniyama, K.:** Site of action of galanin in the cholinergic transmission of guinea pig small intestine. *Eur.J.Pharmacol.* 284, 1995: 149-155
4. **Allescher, H. D., Storr, M., Brechmann, C., Hahn, A. und Schusdziarra, V.:** Modulatory effect of endogenous and exogenous opioids on the excitatory reflex pathway of the rat ileum. *Neuropeptides.* 34, 2000: 62-68
5. **Anand, N. und Paterson, W. G.:** Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. *Am.J.Physiol.* 266, 1994: G123-G131
6. **Bartlet, A. L.:** The effect of vagal stimulation and eserine on isolated guinea-pig oesophagus. *Q.J.Exp.Physiol.Cogn.Med.Sci.* 53, 1968: 170-174
7. **Bayliss, W. M. und E.H.Starling:** The movements and innervation of the small intestine. *J.Physiol.Lond.* 24, 1899: 99-143
8. **Beveridge, A. A. und Taylor, G. S.:** Comparison of nervous control of smooth and striated skeletal muscle. *Proc.Aust.Physiol.Pharmacol.Soc.* 18, 1987: 203-210
9. **Bieger, D.:** The brainstem esophagomotor network pattern generator: a rodent model. *Dysphagia.* 8, 1993: 203-208
10. **Bieger, D. und Triggle, C.:** Pharmacological properties of mechanical responses of the rat oesophageal muscularis mucosae to vagal and field stimulation. *Br.J.Pharmacol.* 84, 1985: 93-106
11. **Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Bogers, J. J., Bult, H., De, Man JG, Oosterbosch, L., Herman, A. G. und Van, Maercke YM:** Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 256, 1991: 441-447
12. **Borjesson, L., Nordgren, S. und Delbro, D. S.:** DMPP causes relaxation of rat distal colon by a purinergic and a nitrgenic mechanism. *Eur.J.Pharmacol.* 334, 1997: 223-231

13. **Botella, A., Delvaux, M., Fioramonti, J., Frexinos, J. und Bueno, L.:** Galanin contracts and relaxes guinea pig and canine intestinal smooth muscle cells through distinct receptors. *Gastroenterology*. 108, 1995: 3-11
14. **Boyce, S., Webb, J. K., Shepherd, S. L., Russel, M. G., Hill, R. G. und Rupniak, N. M.:** Analgesic and toxic effects of ABT-594 resemble epibatidine and nicotine in rats. *Pain*. 85, 2000: 443-450
15. **Boyd, R. T.:** The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Crit.Rev.Toxicol*. 27, 1997: 299-318
16. **Broussard, D. L., Lynn, R. B., Wiedner, E. B. und Altschuler, S. M.:** Solitary premotor neuron projections to the rat esophagus and pharynx: implications for control of swallowing. *Gastroenterology*. 114, 1998: 1268-1275
17. **Buckett, W. R., Marjoribanks, C. E., Marwick, F. A. und Morton, M. B.:** The pharmacology of pancuronium bromide (Org.NA97), a new potent steroidal neuromuscular blocking agent. *Br.J.Pharmacol*. 32, 1968: 671-682
18. **Cannon, W. B.:** *The Mechanical Factors of Digestion*, Arnold, London, 1911
19. **Chen, G., Portman, R. und Wickel, A.:** *J.Pharmacol*. 103, 1954: 330
20. **Christensen, J., Arthur, C. und Conklin, J. L.:** Some determinants of latency of off-response to electrical field stimulation in circular layer of smooth muscle of opossum esophagus. *Gastroenterology*. 77, 1979: 677-681
21. **Christensen, J. und Lund, G. F.:** Esophageal responses to distension and electrical stimulation. *J.Clin.Invest*. 48, 1969: 408-419
22. **Code, C. F. und Schlegel, J. F.:** Motor action of the esophagus and its sphincters. In: *Handbook of physiology*, Section 6., Code, C. F., American Physiological Society, Washington DC, 1968: 1821-1839
23. **Cohen, M. L., Susemichel, A. D., Bloomquist, W. und Robertson, D. W.:** 5-HT₄ receptors in rat but not guinea pig, rabbit or dog esophageal smooth muscle. *Gen.Pharmacol*. 25, 1994: 1143-1148
24. **Conklin, J. L. und Christensen, J.:** Motor Function of the Pharynx and Esophagus. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Johnson, L. R., Raven Press, New York, 1994, Third Edition: 903-928
25. **Crawford, J. M.:** The Gastrointestinal Tract. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease*, Cotran, R. S., Kumar, V., and Collins, T., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999, Sixth Edition: 775-843
26. **Cunningham-ET, Jr und Sawchenko, P. E.:** Central neural control of esophageal motility: a review. *Dysphagia*. 5, 1990: 35-51
27. **Dawson, T. M., Bredt, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M. und Snyder, S. H.:** Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 88, 1991: 7797-7801

28. **De Laet, A., De Man, J. G., Cornelissen, W., Schrod, F., Scheuermann, D. W., Van Bogaert, P.-P., Neuhuber, W. L., Pelckmanns, P. A. und Timmermans, J.-P.:** An electrophysiological and pharmacological study of the innervation of the striated musculature of the rat esophagus. *Neurogastroenterol.Mot.* 11, 1999: 257-257
29. **De, Man JG, Pelckmans, P. A., Boeckxstaens, G. E., Bult, H., Oosterbosch, L., Herman, A. G. und Van, Maercke YM:** The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. *Br.J.Pharmacol.* 103, 1991: 1092-1096
30. **Decktor, D. L. und Ryan, J. P.:** Transmembrane voltage of opossum esophageal smooth muscle and its response to electrical stimulation of intrinsic nerves. *Gastroenterology.* 82, 1982: 301-308
31. **DeGolier, T. F., Nordell, J. N., Pust, M. H. und Duke, G. E.:** Effect of galanin on isolated strips of smooth muscle from the gastrointestinal tract of chickens. *J.Exp.Zool.* 283, 1999: 463-468
32. **Derkx, F. H., Bonta, I. L. und Legendijk, A.:** Species-dependent effect of neuromuscular blocking agents. *Eur.J.Pharmacol.* 16, 1971: 105-108
33. **Dhawan, B. N., Cesselin, F., Raghbir, R., Reisine, T., Bradley, P. B., Portoghese, P. S. und Hamon, M.:** International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol.Rev.* 48, 1996: 567-592
34. **Dockray, G. J.:** Physiology of Enteric Neuropeptides. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Johnson, L. R., Raven Press, New York, 1994, Third Edition: 169-209
35. **Dodds, W. J., Christensen, J., Dent, J., Arndorfer, R. C. und Wood, J. D.:** Pharmacologic investigation of primary peristalsis in smooth muscle portion of opossum esophagus. *Am.J.Physiol.* 237, 1979: E561-E566
36. **Dodds, W. J., Christensen, J., Dent, J., Wood, J. D. und Arndorfer, R. C.:** Esophageal contractions induced by vagal stimulation in the opossum. *Am.J.Physiol.* 235, 1978: E392-E401
37. **Du, C., Murray, J., Bates, J. N. und Conklin, J. L.:** Nitric oxide: mediator of NANC hyperpolarization of opossum esophageal smooth muscle. *Am.J.Physiol.* 261, 1991: G1012-G1016
38. **Durbec, P. L., Larsson, Blomberg LB, Schuchardt, A., Costantini, F. und Pachnis, V.:** Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development.* 122, 1996: 349-358
39. **Ekblad, E., Hakanson, R., Sundler, F. und Wahlestedt, C.:** Galanin: neuromodulatory and direct contractile effects on smooth muscle preparations. *Br.J.Pharmacol.* 86, 1985a: 241-246
40. **Ekblad, E., Rokaeus, A., Hakanson, R. und Sundler, F.:** Galanin nerve fibers in the rat gut: distribution, origin and projections. *Neuroscience.* 16, 1985b: 355-363

41. **Elsevier Trends Journal:** Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement, Cambridge, UK, 1999, 10th Edition
42. **Erspamer, V. and Blaschko, H.:** Handb. exp. Pharmacol., Erspamer, V., Springer, Berlin, 1966
43. **Feelisch, M.:** The use of nitric oxide donors in pharmacological studies [see comments]. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 358, 1998: 113-122
44. **Gershon, M. D.:** 5-HT (serotonin) physiology and related drugs. Curr.Opin.Gastroenterol. 16, 2000: 113-120
45. **Gerzanich, V., Peng, X., Wang, F., Wells, G., Anand, R., Fletcher, S. und Lindstrom, J.:** Comparative pharmacology of epibatidine: a potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Mol.Pharmacol. 48, 1995: 774-782
46. **Goldhill, J., Porquet, M. F. und Angel, I.:** Post-synaptic 5-HT₄ receptor modulation of tachykinergic excitation of rat oesophageal tunica muscularis mucosae. Eur.J.Pharmacol. 323, 1997: 229-233
47. **Greving, R.:** Ztschr.f.ang.Anat.u.Konstit. 5, 1920: 327-357
48. **Grozdanic, Z., Baumgarten, H. G. und Bruning, G.:** Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. Neuroscience. 48, 1992: 225-235
49. **Gruber, H.:** [Structure and innervation of the striated muscle fibres of the esophagus of the rat]
Über Struktur und Innervation der quergestreiften Muskulatur des Oesophagus der Ratte. Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat. 91, 1968: 236-247
50. **Gruber, H.:** Motor innervation of striated oesophageal muscle. Part 2. Characteristics of the oesophagomotor fibres in the rat studied by implanting the vagus nerve into a skeletal muscle. J.Neurol.Sci. 36, 1978a: 171-186
51. **Gruber, H.:** Motor innervation of the striated oesophagus muscle. Part 1. Intramural distribution of the right and left vagus nerve in the rat oesophagus as revealed by the glycogen depletion technique. J.Neurol.Sci. 36, 1978b: 41-53
52. **Gu, Z. F., Pradhan, T. K., Coy, D. H. und Jensen, R. T.:** Galanin-induced relaxation in gastric smooth muscle cells is mediated by cyclic AMP. Peptides. 15, 1994: 1425-1430
53. **Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. und Joyner, A. L.:** Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. Cell. 75, 1993: 463-476
54. **Harting, K.:** Über die Beteiligung des Nervus vagus an der Bildung der intramuralen Nervengeflechte des Oesophagus. Z.mikrosk.-anat.Forsch. 35, 1934: 631-667
55. **Hata, F., Ishii, T., Kanada, A., Yamano, N., Kataoka, T., Takeuchi, T. und Yagasaki, O.:** Essential role of nitric oxide in descending inhibition in the rat proximal colon. Biochem.Biophys.Res.Comm. 172, 1990: 1400-1406

56. **Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A. und Morris, H. R.:** Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*. 258, 1975: 577-580
57. **Humphrey, P. P., Hartig, P. und Hoyer, D.:** A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends.Pharmacol.Sci.* 14, 1993: 233-236
58. **Hwang, K., Essex, H. E. und Mann, F. C.:** A study of certain problems resulting from vagotomy in dogs with special reference to emesis. *Am.J.Physiol.* 149, 1947: 429-448
59. **Illes, P., Jurna, I, Kaever, V. und Resch, K.:** Analgetika und Antiphlogistika. In: *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie*, Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., and Starke, K, Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, 7. Auflage: 201-225
60. **Ingelfinger, F. J.:** Esophageal motility. *Physiol.Rev.* 38, 1958: 533-584
61. **Irwin, D. A.:** The Anatomy of the Auerbach's Plexus. *Am.J.Anat.* 49, 1931: 141-166
62. **Julius, D.:** Another opiate for the masses? [news; comment]. *Nature*. 386, 1997: 442
63. **Jurica, E. J.:** Studies on the motility of the denervated mammalian esophagus. *Am.J.Physiol.* 77, 1926: 269-289
64. **Kablar, B., Tajbakhsh, S. und Rudnicki, M. A.:** Transdifferentiation of esophageal smooth to skeletal muscle is myogenic bHLH factor-dependent. *Development*. 127, 2000: 1627-1639
65. **Kamikawa, Y. und Shimo, Y.:** Cholinergic and adrenergic innervations of the muscularis mucosae in guinea-pig esophagus. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 238, 1979: 220-232
66. **Kamikawa, Y. und Shimo, Y.:** Indirect action of 5-hydroxytryptamine on the isolated muscularis mucosae of the guinea-pig oesophagus. *Br.J.Pharmacol.* 78, 1983a: 103-110
67. **Kamikawa, Y. und Shimo, Y.:** Pharmacological characterization of the opioid receptor in the submucous plexus of the guinea-pig oesophagus. *Br.J.Pharmacol.* 78, 1983b: 693-699
68. **Kamikawa, Y., Shimo, Y. und Uchida, K.:** Inhibitory actions of catecholamines on electrically induced contractions of the submucous plexus-longitudinal muscularis mucosae preparation of the guinea-pig oesophagus. *Br.J.Pharmacol.* 76, 1982: 271-277
69. **Kannan, M. S., Jager, L. P. und Daniel, E. E.:** Electrical properties of smooth muscle cell membrane of opossum esophagus. *Am.J.Physiol.* 248, 1985: G342-G346
70. **Kerr, K. P., Mitchelson, F. und Coupar, I. M.:** Vagal nerve stimulation of the guinea-pig oesophagus. *Acta Physiol.Scand.* 154, 1995a: 213-220

71. **Kerr, K. P., Stevenson, J. E. und Mitchelson, F.:** Simultaneous comparison of nicotinic receptor antagonists on three nicotinic acetylcholine receptors. *J.Pharm.Pharmacol.* 47, 1995b: 1002-1006
72. **Kilbinger, H. und Wolf, D.:** Effects of 5-HT-4 receptor stimulation on basal and electrically evoked release of acetylcholine from guinea-pig myenteric plexus. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 345, 1992: 270-274
73. **Kravitz, J. J., Snape-WJ, Jr und Cohen, S.:** Effect of thoracic vagotomy and vagal stimulation on esophageal function. *Am.J.Physiol.* 234, 1978: E359-E364
74. **Kuramoto, H., Kato, Y., Sakamoto, H. und Endo, Y.:** Galanin-containing nerve terminals that are involved in a dual innervation of the striated muscles of the rat esophagus. *Brain Res.* 734, 1996: 186-192
75. **Kuramoto, H., Kawano, H., Sakamoto, H. und Furness, J. B.:** Motor innervation by enteric nerve fibers containing both nitric oxide synthase and galanin immunoreactivities in the striated muscle of the rat esophagus. *Cell Tissue Res.* 295, 1999: 241-245
76. **Langley, J. N.:** The autonomous nervous system, Part 1, Helfer, W. and and sons, Cambridge, 1921
77. **Lawrentjew, B. J.:** Experimentiell-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems, Teil 2 (Über den Aufbau der Ganglien der Speiseröhre nebst einigen Bemerkungen über das Vorkommen und die Verteilung zweier Arten von Nervenzellen in dem autonomen Nervensystem). *Z.mikrosk.-anat.Forsch.* 18, 1929: 233-262
78. **Lee, B. H., Lynn, R. B., Lee, H. S., Miselis, R. R. und Altschuler, S. M.:** Calcitonin gene-related peptide in nucleus ambiguus motoneurons in rat: viscerotopic organization. *J.Comp.Neurol.* 320, 1992: 531-543
79. **Leung, E. und Mitchelson, F.:** Modification by hexamethonium of the muscarinic receptor blocking activity of pancuronium and homatropine in isolated tissues of the ginea-pig. *Eur.J.Pharmacol.* 80, 1982: 11-17
80. **Lichtenstein, G. R., Reynolds, J. C., Ogorek, C. P. und Parkman, H. P.:** Localization and inhibitory actions of galanin at the feline lower esophageal sphincter. *Regul.Pept.* 50, 1994: 213-222
81. **Ling, H. W.:** Actions of Dimethylphenylpiperazinium. *Br.J.Pharmacol.* 14, 1959: 505-511
82. **Lloyd, G. K., Menzaghi, F., Bontempi, B., Suto, C., Siegel, R., Akong, M., Stauderman, K., Velicelebi, G., Johnson, E., Harpold, M. M., Rao, T. S., Sacaan, A. I., Chavez, Noriega LE, Washburn, M. S., Vernier, J. M., Cosford, N. D. und McDonald, L. A.:** The potential of subtype-selective neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as therapeutic agents. *Life Sci.* 62, 1998: 1601-1606

83. **Lohse, M. J., Forstermann, U. und Schmidt, H. H.:** Pharmacology of NO:cGMP signal transduction [editorial; comment]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 358, 1998: 111-112
84. **Lu, W. Y. und Bieger, D.:** Vagovagal reflex motility patterns of the rat esophagus. *Am.J.Physiol.* 274, 1998: R1425-R1435
85. **Mayer, B. und Andrew, P.:** Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition [see comments]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 358, 1998: 127-133
86. **Meunier, J. C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B. und et, al:** Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor [see comments]. *Nature.* 377, 1995: 532-535
87. **Moczydlowski, E., Olivera, B. M., Gray, W. R. und Strichartz, G. R.:** Discrimination of muscle and neuronal Na-channel subtypes by binding competition between [3H]saxitoxin and mu-conotoxins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83, 1986: 5321-5325
88. **Moumami, C., Yang, D. C. und Gullikson, G. W.:** 5-HT₄ receptor activation induces relaxation and associated cAMP generation in rat esophagus. *Eur.J.Pharmacol.* 216, 1992: 47-52
89. **Murray, J., Du, C., Ledlow, A., Bates, J. N. und Conklin, J. L.:** Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum esophageal muscle. *Am.J.Physiol.* 261, 1991: G401-G406
90. **Neuhuber, W. L., Eichhorn, U. und Worl, J.:** Enteric co-innervation of striated muscle fibers in the esophagus: just a "hangover"? *Anat.Rec.* 262, 2001: 41-46
91. **Neuhuber, W. L., Kressel, M., Stark, A. und Berthoud, H. R.:** Vagal efferent and afferent innervation of the rat esophagus as demonstrated by anterograde DiI and DiA tracing: focus on myenteric ganglia. *J.Auton.Nerv.Syst.* 70, 1998: 92-102
92. **Neuhuber, W. L., Worl, J., Berthoud, H. R. und Conte, B.:** NADPH-diaphorase-positive nerve fibers associated with motor endplates in the rat esophagus: new evidence for co-innervation of striated muscle by enteric neurons. *Cell Tissue Res.* 276, 1994: 23-30
93. **Nishiwaki, H., Saitoh, N., Nishio, H., Takeuchi, T. und Hata, F.:** Inhibitory effect of endomorphin-1 and -2 on acetylcholine release from myenteric plexus of guinea pig ileum. *Jpn.J.Pharmacol.* 78, 2000: 83-86
94. **Oppel, A.:** *Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere*, Gustav Fischer, Jena, 1897
95. **Osinski, M. A., Pampusch, M. S., Murtaugh, M. P. und Brown, D. R.:** Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract. *Eur.J.Pharmacol.* 365, 1999: 281-289

96. **Patapoutian, A., Wold, B. J. und Wagner, R. A.:** Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science*. 270, 1995: 1818-1821
97. **Qian, C., Li, T., Shen, T. Y., Libertine-Garahan, L., Eckman, J., Biftu, T. und Ip, S:** Epibatidine is a nicotinic analgesic. *Eur.J.Pharmacol.* 250, 1993: R13-R14
98. **Reinscheid, R. K., Nothacker, H. P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R. A., Buzow, J. R., Grandy, D. K., Langen, H., Monsma-FJ, Jr und Civelli, O.:** Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*. 270, 1995: 792-794
99. **Rizzi, A., Bigoni, R., Calo, G., Guerrini, R., Salvadori, S. und Regoli, D.:** [Nphe(1)]nociceptin-(1-13)-NH(2) antagonizes nociceptin effects in the mouse colon. *Eur.J.Pharmacol.* 385, 1999: R3-R5
100. **Said, S. I. und Mutt, V.:** Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*. 169, 1970a: 1217-1218
101. **Said, S. I. und Mutt, V.:** Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature*. 225, 1970b: 863-864
102. **Sang, Q., Ciampoli, D., Greferath, U., Sommer, L. und Young, H. M.:** Innervation of the esophagus in mice that lack MASH1. *J.Comp.Neurol.* 408, 1999: 1-10
103. **Sang, Q. und Young, H. M.:** Development of nicotinic receptor clusters and innervation accompanying the change in muscle phenotype in the mouse esophagus. *J.Comp.Neurol.* 386, 1997: 119-136
104. **Schultzberg, M., Hokfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J. F., Brown, M., Elde, R., Goldstein, M. und Said, S.:** Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine beta-hydroxylase. *Neuroscience*. 5, 1980: 689-744
105. **Singaram, C., Sengupta, A., Sweet, M. A., Sugarbaker, D. J. und Goyal, R. K.:** Nitrinergic and peptidergic innervation of the human oesophagus. *Gut*. 35, 1994: 1690-1696
106. **Singh, S. und Prior, C.:** Prejunctional effects of the nicotinic ACh receptor agonist dimethylphenylpiperazinium at the rat neuromuscular junction. *J.Physiol.Lond.* 511, 1998: 451-460
107. **Smith, T. K. und McCarran, S. L.:** Nitric oxide modulates cholinergic reflex pathways to the longitudinal and circular muscle in the isolated guinea-pig distal colon. *J.Physiol.* 512, 1998: 893-906
108. **Sotirov, E. S., Itzev, D. E. und Papisova, M. P.:** Modulation of electrically evoked responses in rat duodenum by activation of nicotinic cholinergic receptors. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 25, 1998: 331-335

109. **Tonini, M., Fiori, E., Balestra, B., Spelta, V., D'Agostino, G., Di Nucci, A., Brecha, N. C. und Sternini, C.:** Endomorphin-1 and endomorphin-2 activate mu-opioid receptors in myenteric neurons of the guinea-pig small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 358, 1998: 686-689
110. **Uc, A., Oh, S. T., Murray, J. A., Clark, E. und Conklin, J. L.:** Biphasic relaxation of the opossum lower esophageal sphincter: roles of NO, VIP, and CGRP. *Am.J.Physiol.* 277, 1999: G548-G554
111. **Waikar, M. V., Hegde, S. S., Ford, A. P. und Clarke, D. E.:** Pharmacological analyses of endo-6-methoxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl-2,3-dihydro-2-oxo-1 H- benzimidazole-1-carboxylate hydrochloride (DAU 6285) at the 5-hydroxytryptamine₄ receptor in the tunica muscularis mucosae of rat esophagus and ileum of guinea pig: role of endogenous 5-hydroxytryptamine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 264, 1993: 654-661
112. **Wang, J. B., Johnson, P. S., Imai, Y., Persico, A. M., Ozenberger, B. A., Eppler, C. M. und Uhl, G. R.:** cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* 348, 1994: 75-79
113. **Weisbrodt, N. W. und Christensen, J.:** Gradients of contractions in the opossum esophagus. *Gastroenterology.* 62, 1972: 1159-1166
114. **Will, S., Bieger, D. und Triggle, C. R.:** NO: possible role in TTX-sensitive field-stimulated relaxations of the rat oesophageal tunica muscularis mucosae? *Eur.J.Pharmacol.* 183, 1990: 2419-2420
115. **Woollard, D. J., Bornstein, J. C. und Furness, J. B.:** Characterization of 5-HT receptors mediating contraction and relaxation of the longitudinal muscle of guinea-pig distal colon in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 349, 1994: 455-462
116. **Worl, J., Fischer, J. und Neuhuber, W. L.:** Nonvagal origin of galanin-containing nerve terminals innervating striated muscle fibers of the rat esophagus. *Cell Tissue Res.* 292, 1998: 453-461
117. **Worl, J., Mayer, B. und Neuhuber, W. L.:** Nitroergic innervation of the rat esophagus: focus on motor endplates. *J.Auton.Nerv.Syst.* 49, 1994: 227-233
118. **Worl, J., Mayer, B. und Neuhuber, W. L.:** Spatial relationships of enteric nerve fibers to vagal motor terminals and the sarcolemma in motor endplates of the rat esophagus: a confocal laser scanning and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 287, 1997: 113-118
119. **Yamato, S., Spechler, S. J. und Goyal, R. K.:** Role of nitric oxide in esophageal peristalsis in the opossum. *Gastroenterology.* 103, 1992: 197-204
120. **Yang, D. C., Goldstin, B., Moormann, A. E., Flynn, D. L. und Gullikson, G. W.:** SC-53606, a potent and selective antagonist of 5-hydroxytryptamine₄ receptors in isolated rat esophageal tunica muscularis mucosae. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 266, 1993: 1339-1347

121. **Yazdani, A., Takahashi, T., Bagnol, D., Watson, S. J. und Owyang, C.:** Functional significance of a newly discovered neuropeptide, orphanin FQ, in rat gastrointestinal motility. *Gastroenterology*. 116, 1999: 108-117
122. **Yokotani, K. und Osumi, Y.:** Involvement of mu-receptor in endogenous opioid peptide-mediated inhibition of acetylcholine release from the rat stomach. *Jpn.J.Pharmacol.* 78, 1998: 93-95
123. **Zhang, G., Murray, T. F. und Grandy, D. K.:** Orphanin FQ has an inhibitory effect on the guinea pig ileum and the mouse vas deferens. *Brain Res.* 772, 1997: 102-106

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Nervus vagus-Stimulation. Der isolierte Ösophagus wurde in ein beheiztes (37°), doppelwandiges Organbad mit KRS plaziert und mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 begast. Dabei wurde mittels eines Fadens das aborale Ende mit einem Elektrodenhalter, das orale Ende mit einem Kraftwandler verbunden. Die Nn. vagi wurden 1,5 cm vom Ösophagus entfernt an eine bipolare Stimulationselektrode befestigt und mittels eines Stimulators elektrisch stimuliert.

Abbildung 2: Typische Kontraktionsantwort nach Nervus vagus-Stimulation (40 V, 0,5 ms, 20 Hz, 1000 ms). Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die für die Auswertung relevanten Messwerte: KA_1 = Maximale Kontraktionsamplitude der initialen schnellen Komponente und KA_2 = Maximale Kontraktionsamplitude nach Beendigung des elektrischen Reizes. Der horizontale Balken kennzeichnet den elektrischen Stimulus von 1000 ms Dauer.

Abbildung 3: a, Einfluß von Atropin (10^{-6} M), Tubocurarin (10^{-5} M) und b, TTX (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort eines Ösophagmuskelstreifens nach TES (20 V, 0,2 ms, 0,1 Hz) (Originalaufzeichnungen zweier Präparationen).

Abbildung 4: Einfluß von Atropin (10^{-6} M), Tubocurarin (10^{-5} M), Pancuronium (10^{-5} M) und TTX (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort nach TES (20 V, 0,2 ms, 0,1 Hz). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star\star = p < 0,01$; $\star\star\star = p < 0,001$.

Abbildung 5: Einfluß von L-NNA (10^{-4} M), L-NNA (10^{-4} M) + L-Arginin (10^{-3} M), ODQ (10^{-5} M) und L-Arginin (10^{-3} M) alleine auf die Kontraktionsantwort nach TES (20 V, 0,2 ms, 0,1 Hz). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Änderungen der Kontraktionsamplituden erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Abbildung 6: Originalaufzeichnung der biphasischen Kontraktionsantwort nach ENVS in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz (1-50 Hz). Standardstimulationsparameter: 40 V, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer.

Abbildung 7: Frequenz-Kontraktionskurven der beiden Kontraktionsantworten nach ENVS unter Standardstimulationsparameter (40 V, 0,5 ms, 1 s). 100% Kontraktionskraft = maximale Kontraktionsamplitude der jeweiligen Kontraktionsantwort beobachtet bei 1-50 Hz. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt (n=13).

Abbildung 8: Originalaufzeichnungen der Kontraktionsantworten nach vagaler Stimulation vor und nach Zugabe von a) Tubocurarin (10^{-5} M), b) Atropin (10^{-6} M), c) Hexamethonium (10^{-4} M) und d) Tetrodotoxin (10^{-6} M). Standardstimulationsparameter: 40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer. VS: Vagale Stimulation.

Abbildung 9: Einfluß von Tubocurarin (10^{-5} M), Atropin (10^{-6} M), Hexamethonium (10^{-4} M) und Tetrodotoxin (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star = p < 0,05$; $\star\star = p < 0,01$; $\star\star\star = p < 0,001$.

Abbildung 10: Einfluß von Galanin (10^{-8} M, 10^{-7} M) und anschließender, zusätzlicher Inkubation mit dem Galaninantagonisten Galanin 1-15 (2×10^{-7} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star = p < 0,05$; $\star\star = p < 0,01$; $\star\star\star = p < 0,001$.

Abbildung 11: Einfluß von VIP (10^{-7} M) und anschließender, zusätzlicher Inkubation mit dem VIP-Antagonisten VIP 10-28 (5×10^{-7} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★★★= $p < 0,001$.

Abbildung 12: Einfluß von Serotonin (5-HT, 10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★= $p < 0,05$.

Abbildung 13: Einfluß von L-NNA (10^{-4} M) und anschließender, zusätzlicher Inkubation mit L-Arginin (10^{-3} M) bzw. Einfluß von exogenem NO (DEA-NO, 10^{-4} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★= $p < 0,05$.

Abbildung 14: Einfluß von L-Arginin (10^{-3} M) alleine und ODQ (10^{-5} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Änderungen der Kontraktionsamplituden erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Abbildung 15: Einfluß des κ -Agonisten U-69593 (10^{-7} M, 10^{-6} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe des κ -Rezeptorantagonisten Binaltorphimin (10^{-5} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★= $p < 0,05$.

Abbildung 16: Einfluß des μ -Agonisten Endomorphin-1 (10^{-6} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe des Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★★★= $p < 0,01$.

Abbildung 17: Originalaufzeichnungen der Kontraktionsantworten nach vagaler Stimulation vor und nach Zugabe des μ -Rezeptoragonisten Endomorphin-2 (10^{-6} M) und anschließender Inkubation des Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (10^{-6} M). Standardstimulationsparameter: 40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer. VS: Vagale Stimulation.

Abbildung 18: Einfluß des μ -Agonisten Endomorphin-2 (10^{-6} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe des Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★= $p < 0,05$; ★★= $p < 0,01$; ★★★= $p < 0,001$.

Abbildung 19: Einfluß des ORL₁-Rezeptoragonisten Nociceptin (10^{-8} M, 10^{-7} M) und anschließender, zusätzlicher Zugabe von Naloxon (10^{-6} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★= $p < 0,05$; ★★= $p < 0,01$; ★★★= $p < 0,001$.

Abbildung 20: Originalaufzeichnungen der Kontraktionsantworten nach vagaler Stimulation vor und nach Zugabe des ganglionären nikotinergen Agonisten DMPP (10^{-4} M). Standardstimulationsparameter: 40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer. Vertikaler Balken: 1g Spannung; horizontaler Balken: elektrischer Stimulus von 1 s Dauer. VS: Vagale Stimulation.

Abbildung 21: Einfluß des ganglionären nikotinergen Agonisten DMPP (10^{-5} M, 10^{-4} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star\star=p<0,01$.

Abbildung 22: Einfluß des ganglionären nikotinergen Agonisten Epibatidin (10^{-10} M- 10^{-7} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer). Die Kontraktionskraft nach Zugabe der Substanzen ist ausgedrückt als Prozentanteil der Kontraktionsantwort der Kontrolle (=100 %). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star=p<0,05$; $\star\star\star=p<0,001$.

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die Einflüsse der verwendeten Substanzen auf die Kontraktionsantwort isolierter Muskelstreifen des Rattenösophagus nach TES, ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star\star=p<0,01$; $\star\star\star=p<0,001$; n.s.= nicht signifikant.

Tabelle 2: Einfluß der Stimulationsfrequenz (n=13) und anschließender Vagotomie (n=2) auf die durch ENVS induzierte biphasische Kontraktionsantwort bei 40 V, 0,5 ms und 1 s Stimulationsdauer. 100% Kontraktionskraft = maximale Kontraktionsamplitude der jeweiligen Kontraktionsantwort beobachtet bei 1-50 Hz. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt.

Tabelle 3: Einfluß von Galanin, Galanin 1-15, VIP, VIP 10-28 und Serotonin auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star=p<0,05$; $\star\star=p<0,01$; $\star\star\star=p<0,001$; $\# =p<0,05$; $\#\# =p<0,01$ (Agonist +Antagonist vs. Agonist); n.s.= nicht signifikant.

Tabelle 4: Einfluß von L-NNA (10^{-4} M), L-NNA (10^{-4} M) + L-Arginin (10^{-3} M), DEA-NO (10^{-3} M), ODQ (10^{-5} M) und L-Arginin (10^{-3} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star=p<0,05$.

Tabelle 5: Übersicht über Wirkung der verwendeten spezifischen Agonisten und anschließender Zugabe der Antagonisten der verschiedenen Opioidrezeptoren auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. $\star=p<0,05$; $\star\star=p<0,01$; $\star\star\star=p<0,001$ (vs. Kontrolle). $\# =p<0,05$; $\#\# =p<0,01$ (Agonist +Antagonist vs. Agonist); n.s.= nicht signifikant.

Tabelle 6: Einfluß der verwendeten Antagonisten der verschiedenen Opioidrezeptoren auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach ENVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in % im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Änderungen der Kontraktionsamplituden erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Tabelle 7: Übersicht über Wirkung der ganglionären nikotinergen Agonisten DMPP (10^{-5} M, 10^{-4} M) und Epibatidine (10^{-10} M- 10^{-7} M) alleine und in Anwesenheit von L-NNA (10^{-4} M) auf die Kontraktionsantwort der quergestreiften und glatten Muskulatur des Rattenösophagus nach NVS (40 V, 20 Hz, 0,5 ms Impulsdauer, 1 s Stimulationsdauer), ausgedrückt als Änderung der Kontraktionsamplitude in

% im Vergleich zur Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. ★= $p<0,05$; ★★= $p<0,01$; ★★★= $p<0,001$; n.s.= nicht signifikant.

Tabelle 8: Klassifizierung, Zusammensetzung und grobes Verteilungsmuster der Subtypen des nikotinergen Ach-Rezeptors. α -Bgt= α -Bungarotoxin.

9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
α -Bgt	α -Bungarotoxin
Ach	Acetylcholin
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca^{2+}	Zweiwertige Kalziumionen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
cm	Zentimeter
DEA-NO	Diethylamid-Stickstoffmonoxid
DMPP	1,1-Dimethyl-4-phenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulfoxidyl
ENS	Enterisches Nervensystem
ENVS	Elektrische Nervus vagus-Stimulation
g	Gramm
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
IGLE's	Intraganglionäre laminäre Endigungen
K^{+}	Kaliumionen

KCl	Kaliumchlorid
KRS	Krebs-Ringer-Lösung
L-NNA	N ^ω -Nitro-L-Arginin
L-NMA	N ^ω -Methyl-L-Arginin
M	Molar
min	Minute(n)
MCH	skeletal fast myosin heavy chain
MLCK	smooth myosin light chain
ms	Millisekunde(n)
n	number, Fallzahl
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
Ncl.	Nucleus
NANC	Nicht-adrenerg nicht-cholinerg
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OÖS	Oberer Ösophagussphinkter
ODQ	¹ H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one
ORL	Opioid receptor-like
s	Sekunde(n)
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
Tab.	Tabelle
TES	Transmurale elektrische Stimulation
TMM	Tunica muscularis mucosae
TTX	Tetrodotoxin
UÖS	Unterer Ösophagussphinkter
V	Volt

VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin

10. Danksagung

Meinen Dank möchte ich all denen aussprechen, die mir sowohl im Labor als auch beim Verfassen dieser Dissertationsarbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. H.D. Allescher für das Überlassen des Themas sowie für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung meiner Arbeit. Als jederzeit bereiter Ansprechpartner, der mir in jeder Phase dieser Dissertationsarbeit auch als freundschaftlicher Ratgeber zur Seite stand, vermittelte er mir mit Geduld und großer Hilfsbereitschaft die Grundlagen wissenschaftlicher Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen akademischen Lehrern, Herrn Prof. Dr. med M. Classen und Herrn Prof. Dr. med. V. Schusdziarra für die freundliche Aufnahme an Ihrer Klinik und die Bereitstellung der technischen Einrichtungen.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. med. M. Storr für die Anleitung und wissenschaftliche Betreuung dieser Dissertationsarbeit und bei Herrn J. P. Zimmermann für tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Lebenslauf

Fabian Konstantin Geisler

15.09.1973 geboren in Rosenheim, Sohn von Helmut Geisler, Kaufmann und Heidrun Geisler, Lehrerin.

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule a.d. Prinzregentenstraße in Rosenheim

1984-1993 Ignaz-Günther-Gymnasium Rosenheim
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

1990-1991 Croton-Harmon-Highschool (New York)
Abschluß: Highschool-Diploma

Hochschulbildung:

1994-1996 Vorklinik an der LMU München

1996-2000 TU München

25.3.1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)

13.9.1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)

1997-1999 Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit an der TU München, II. Medizinische Klinik, Klinikum Rechts der Isar,
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hans-Dieter Allescher

1999-2000 Praktisches Jahr am Klinikum Rechts der Isar in Pathologie und Innerer Medizin (II. Med. Klinik), Chirurgie am Krankenhaus München Bogenhausen

14.11.2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

seit 1.1.2001 Arzt im Praktikum an der II. Medizinischen Klinik, Klinikum Rechts der Isar der TU München