

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

**(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Drs.h.c. (Univ. Istanbul/Türkei; UMF Iassy;  
Univ. Athen) M. Classen)**

---

**Mechanismen der nicht-adrenerg nicht-cholinerg  
vermittelten Relaxation am  
Magenfundus der Ratte**

Robert Philipp Martin Foellmer

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

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl.Prof. Dr. H.-D. Allescher  
2. Univ.-Prof. Dr. Drs.h.c. (Univ. Istanbul/Türkei;  
UMF Iassy; Univ. Athen) M. Classen

Die Dissertation wurde am 30.11.2000 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 10.01.2001 angenommen.

**Meinen Eltern gewidmet**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>4</b>
<u>2.1 Material.....</u>	<u>4</u>
2.1.1 Versuchstiere.....	4
<u>2.2 Methoden.....</u>	<u>4</u>
2.2.1 Präparation und Versuchsaufbau .....	4
2.2.2 Versuchsdurchführung.....	6
2.2.3 Geräte und Chemikalien .....	8
<u>2.3 Statistik.....</u>	<u>9</u>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>10</b>
<u>3.1 Basalaktivität.....</u>	<u>10</u>
<u>3.2 Isometrische bzw. auxotonische Kontraktion .....</u>	<u>10</u>
3.2.1 Isometrische Kontraktion .....	11
3.2.2 Auxotonische Kontraktion .....	11
<u>3.3 Konzentrationsabhängige Kontraktion nach Serotoninzugabe .....</u>	<u>13</u>
<u>3.4 Stabilität des Serotonin-induzierten Plateaus .....</u>	<u>14</u>
<u>3.5 Einfluß von Elektrischer Feldstimulation (EFS) auf den Muskelstreifen</u>	<u>15</u>
3.5.1 Einfluß von Atropin und Guanethidin auf die EFS.....	15
3.5.2 Elektrische Feldstimulation unter NANC-Bedingungen.....	17
<u>3.6 Auswertung.....</u>	<u>20</u>
3.6.1 Versuchsablauf EFS .....	20
3.6.2 Versuchsablauf Peptide.....	21
3.6.3 Versuchsablauf DEA-NO .....	24
<u>3.7 Einfluß des Blockers neuronaler Übertragung Tetrodotoxin (TTX) .....</u>	<u>25</u>
<u>3.8 Einfluß des Inhibitors der NO Synthase N<math>\omega</math>-Nitro L-Arginin (L-NNA) ....</u>	<u>26</u>
3.8.1 Einfluss auf die EFS .....	27
3.8.2 Einfluß auf die VIP und ANP induzierte Relaxation .....	29
<u>3.9 Einfluß von Apamin.....</u>	<u>30</u>
<u>3.10 Einfluß des Inhibitors der löslichen Guanylatzyklase ODQ.....</u>	<u>32</u>
3.10.1 Einfluß auf die EFS.....	32
3.10.2 Einfluß auf die DEA NO induzierte Relaxation.....	34
3.10.3 Einfluß auf die VIP und ANP induzierte Relaxation .....	36
<u>3.11 Einfluß des Inhibitors der Proteinkinase A KT 5720.....</u>	<u>38</u>
Einfluß auf die EFS.....	39

3.11.2	Einfluß auf die VIP und ANP induzierte Relaxation .....	41
<b>3.12</b>	<b><u>Einfluss des Inhibitors der Phosphodiesterase V Zaprinast</u></b> .....	<b>43</b>
3.12.1	Einfluß auf die EFS.....	43
3.12.2	Einfluß auf die VIP induzierte Relaxation.....	45
3.12.3	Einfluss auf die DEA-NO induzierte Relaxation .....	47
<b>3.13</b>	<b><u>Einfluß des Inhibitors der Phosphodiesterase III Trequinsin</u></b> .....	<b>48</b>
3.13.1	Einfluß auf die EFS.....	48
3.13.2	Einfluß auf die VIP induzierte Relaxation.....	50
3.13.3	Einfluß auf die DEA NO induzierte Relaxation.....	52
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b><u>Allgemeine Diskussion</u></b> .....	<b>54</b>
4.1.1	Rezeptive und adaptative Relaxation .....	54
4.1.2	Nicht-adrenerg nicht-cholinerg (NANC) vermittelte Relaxation .....	55
4.1.3	Methodikvergleich.....	65
<b>1.2</b>	<b><u>Spezielle Diskussion</u></b> .....	<b>71</b>
1.2.1	Einfluß des Inhibitors der NO-Synthase L-NNA .....	72
1.2.2	Einfluß des Inhibitors der löslichen Guanylatzyklase ODQ.....	74
1.2.3	Einfluß des Inhibitors der Proteinkinase A KT 5720.....	76
1.2.4	Einfluß des Inhibitors der Phosphodiesterase V Zaprinast .....	78
1.2.5	Inhibitor der Phosphodiesterase III Trequinsin.....	80
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit .....</b>	<b>83</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungs-und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>Verzeichniss der verwendeten Abkürzungen .....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>104</b>

## 1. Einleitung

Die Charakterisierung der Neurotransmitter der nicht-adrenerg nicht-cholinerg (NANC) vermittelten Relaxation im Magen-Darm-Trakt und deren zelluläre Wirkungsweise ist trotz langjähriger Forschung noch nicht vollständig abgeschlossen.

So haben sich im Magenfundus und im übrigen Magen-Darm-Trakt im wesentlichen Stickstoffmonoxid (NO), das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) sowie die Purine mit ihrem Hauptvertreter Adenosintriphosphat (ATP) als die wichtigsten Neurotransmitter herauskristallisiert.

NO, für das neben dem bereits länger bekannten relaxierenden Effekt auf die Gefäßmuskulatur auch eine inhibitorische Wirkung auf die glatte Darmmuskulatur gezeigt werden konnte<sup>40</sup>(S. 103),<sup>59</sup>(S. 305) ist ein wichtiger Transmitter, der nach Freisetzung eine schnell einsetzende, kurz anhaltende Relaxation bewirkt.

Auch im Magenfundus der Ratte konnte der relaxierende Effekt von NO nachgewiesen werden<sup>14</sup>(S. 347).

Vermittelt wird der NO-Effekt über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und einer daraus resultierenden Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels<sup>51</sup>(S. 110), wofür es auch am Magenfundus der Ratte Hinweise gibt<sup>53</sup>(S. 1441). Durch die Erhöhung des cGMP-Spiegels wird eine Vielzahl von Enzymen, unter anderem eine cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert, die letztendlich in einer Relaxation resultieren<sup>42</sup>(S. 9265).

Das aus 28 Aminosäuren bestehende VIP wurde ebenfalls als potenter inhibitorischer Transmitter identifiziert. So zeigte sich unter anderem an isolierten Muskelzellen aus dem Magen des Meerschweins ein relaxierender Effekt, der nach Aktivierung der Adenylatzyklase mit einer Erhöhung des cAMP-Spiegels einherging<sup>46</sup>(S. 205).

Unklarheit herrscht darüber, ob der VIP-Effekt, der durch lang anhaltende Relaxationen gekennzeichnet ist, auch über einen NO-abhängigen Mechanismus vermittelt wird. So gibt es Hinweise für eine Beteiligung der NO

bildenden NO-Synthase an der VIP-vermittelten Relaxation<sup>46</sup>(S. 471),<sup>59</sup>(S. 307), sowie für einen NO Synthase unabhängigen Weg<sup>54</sup>(S. 176),<sup>10</sup>(S. 446).

Neben VIP zeigte sich, daß auch das normalerweise aus atrialen Myozyten freigesetzte atriale natriuretische Peptid (ANP) einen relaxierenden Effekt auf die glatte Muskulatur des Magens hat<sup>21</sup>(S. 1618). Es gibt Hinweise dafür, daß ANP seine Wirkung über eine Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase entfaltet<sup>51</sup>(S. 2786), unklar ist hier jedoch, ob auch ein NO-abhängiger Mechanismus an der Vermittlung der Relaxation beteiligt ist.

Ferner konnte eine Beteiligung der Purine mit ihrem Hauptvertreter Adenosintriphosphat (ATP) bei der inhibitorischen Neurotransmission nachgewiesen werden<sup>17</sup>(S. 1).

Bei der Regulation der Relaxation spielen außerdem Phosphodiesterasen, die durch den Abbau der zyklischen Nukleotide den inhibitorischen Effekt terminieren, eine wichtige Rolle. Auch im Magenfundus der Ratte zeigte sich eine Beteiligung der Phosphodiesterasen bei der Regulation der Relaxation<sup>5</sup>(S. 317).

Das Zusammenspiel von NO und VIP, wobei NO für den schnellen Beginn, VIP für die Aufrechterhaltung der Relaxation verantwortlich gemacht wird, ist im Magenfundus als wohl bedeutendster Neurotransmissionsweg zu verstehen<sup>12</sup>(S. 113).

In dem vorliegenden Modell wurde nach der von Vane<sup>83</sup>(S. 142) beschriebenen Methode der Einfluß inhibitorischer Neurotransmitter an isolierten longitudinalen Muskelstreifen aus dem Magenfundus der Ratte untersucht.

Als inhibitorische Stimuli wurden dabei die durch elektrische Feldstimulation induzierte Neurotransmitterfreisetzung, die Zugabe von VIP und ANP sowie des NO-Donors Diäthylamid NO (DEA NO) verwendet.

Dabei wurde die nicht-adrenerg nicht-cholinerg (NANC) vermittelte Relaxation insbesondere mit folgenden Fragestellungen untersucht:

- Wie wirkt sich die Aufzeichnung isometrischer bzw. auxotonischer Kontraktionen der Muskelstreifen auf das Kontraktionsmuster der durch

Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) stimulierten Muskelstreifen aus und wie beeinflusst dies die Beurteilung der Ergebnisse?

- Wie wird die relaxierende Wirkung von NO und VIP, die exogen zugegeben oder durch elektrische Feldstimulation (EFS) bzw. basal freigesetzt werden, durch Inhibitoren der NO-Synthase (L-NNA), der löslichen Guanylatzyklase (ODQ), der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (KT 5720) sowie des Inhibitors der  $Ca^{2+}$  abhängigen Kaliumkanäle mit niedriger Leitfähigkeit Apamin beeinflusst?
- Wie wird die relaxierende Wirkung von exogen zugegebenem ANP durch Inhibitoren der NO-Synthase (L-NNA), der löslichen Guanylatzyklase (ODQ) und der Proteinkinase A (KT 5720) beeinflusst?
- Wie wird der relaxierende Effekt von EFS und exogen zugegebenem NO bzw. VIP durch Inhibitoren der cGMP-inhibierten cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE III) Trequinsin und der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE V) Zaprinast beeinflusst?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten der Firma Charles River verwendet. Das Gewicht der Tiere lag zwischen ca. 250 - 350 gr. Sie wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen in einem vollklimatisierten Raum (20 Grad Celsius) in einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Sie wurden mit Wasser und Trockenfutter ernährt. Ihnen wurde mindestens 14 h vor dem Versuch das Futter entzogen, sie hatten jedoch weiterhin Zugang zum Wasser.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Präparation und Versuchsaufbau

Die Versuchstiere wurden nach einer CO<sub>2</sub> Kurznarkose mit einer intraperitonealen Injektion Pentobarbital (Nacoren®) in einer Dosierung von 75 mg/kg anästhesiert. Nach Eintreten der adäquaten Narkosetiefe wurde das Abdomen mit einem Längsschnitt eröffnet und der Magen dargestellt. Nach Abpräparation von Omentum maius und der Magenligamenta wurde der Magen von Ösophagus und Duodenum getrennt, entnommen und in ein Bad mit Krebs-Ringer-Puffer (MgSO<sub>4</sub> 1,16 mM, NaCl 115,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,16, Glucose 11,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 21,9 mM, CaCl 2,5mM, KCl 4,16 mM) gebracht, das mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast wurde.

Der Magen wurde dann entlang der kleinen Krümmung eröffnet, umgestülpt und sorgfältig gespült.

Anschließend wurden aus dem Fundus sechs longitudinale Streifen von 0,3-0,5 cm Breite und 1,0- 1,2 cm Länge geschnitten. Die Streifen wurden auf einen nicht elastischen Faden gezogen und mit dem aboralen Ende nach unten in ein doppelwandiges Organbad eingebracht, das 4 ml KRP enthielt und ebenfalls mit Carbogen begast wurde. Von außen wurde das Organbad durch einen Heizkreislauf bei 37 Grad Celsius konstant gehalten.



Der Faden am oralen Ende des Streifens wurde so an einem Kraftwandler befestigt, daß ausschließlich Kontraktionen der Längsmuskulatur aufgezeichnet wurden. In einem Teil der Versuche geschah dies direkt an dem Kraftwandler, die übrigen Versuche wurden jedoch unter Zwischenschaltung einer Silberfeder (D=1g/cm) durchgeführt.

Das in elektrische Spannungsänderungen umgewandelte Signal wurde über einen Verstärker mit 100- bzw. 1000-facher Verstärkung auf einem Schreiber der Firma Rikadenki aufgezeichnet. Die eingespannten Streifen wurden zu Versuchsbeginn jeweils unter 1 g Vorspannung gesetzt.

Den Versuchsaufbau verdeutlicht das folgende Schaubild:

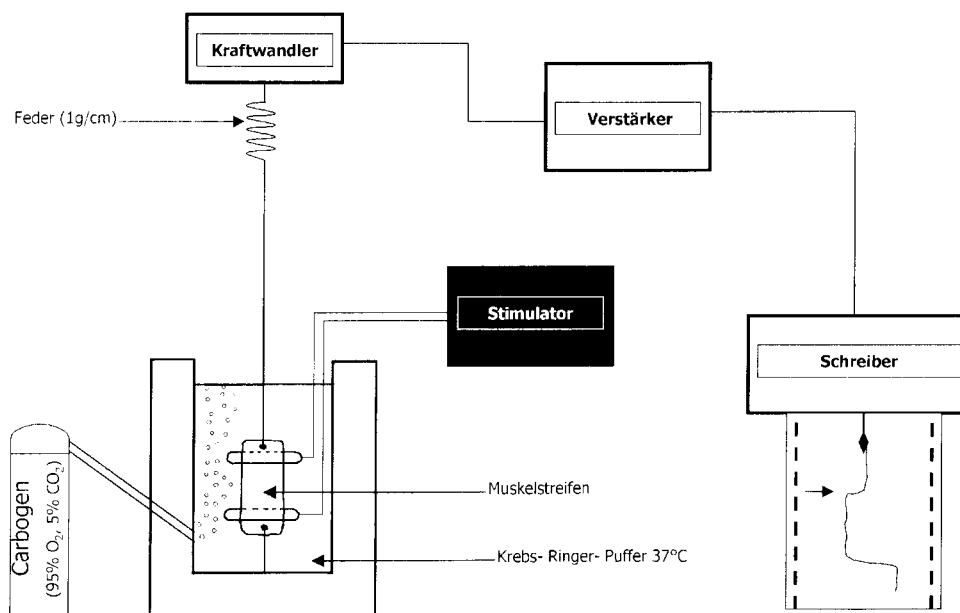


Abb.1: Schematische Darstellung des verwendeten Versuchsaufbaus mit beteiligten Komponenten. Bei Bestimmung der auxotonischen Kontraktion wurde die angegebene Feder verwendet, bei der isometrischen Kraftaufnahme wurde ohne Feder gearbeitet.

Zur Ausschaltung von adrenergen und cholinergen Effekten wurde dem Krebs-Ringer-Puffer Atropin (1µM) zur Blockade der m-Cholinorezeptoren und Guanethidin (1 µM) zur Entleerung der adrenergen Speicher beigelegt.

Dann wurde unter mehrmaligem Spülen das System mindestens 30 min. äquilibriert, bevor mit den Versuchen begonnen wurde.

## 2.2.2 Versuchsdurchführung

Zur besseren Beurteilung von Tonusänderungen der Muskelstreifen wurden die Streifen mit Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin ( $10^{-7}$  [mol/l]) vorstimuliert.

Durch die Zugabe kontrahierten sich die Muskelstreifen submaximal und reversibel, wobei sich die Muskelstreifen ca. 2-3 min. nach der Serotoninzugabe auf ein konstantes Kontraktionsniveau (Plateau) einstellten. An diesen prästimulierten Streifen wurde der inhibitorische Einfluß von Peptiden, elektrischer Feldstimulation (EFS) und NO-Donoren sowie deren Beeinflußbarkeit durch spezifische Blocker untersucht.

### 2.2.2.1 Elektrische Feldstimulation (EFS)

Es wurde die Wirkung von Neurotransmittern, die mittels elektrischer Feldstimulation freigesetzt wurden, auf die mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) prästimulierten Muskelstreifen untersucht.

Dabei wurden die Streifen wie beschrieben präpariert und im Organbad auf eine Befestigung montiert, an der zusätzlich zwei zirkuläre Stimulationselektroden jeweils um die Streifen platziert wurden, die mit einem Stimulator verbunden waren.

Stimuliert wurde mit repetitiven Impulsen verschiedener Feldstärken, Frequenzen und Dauer.

Folgende Stimulationsparameter wurden verwendet:

- 40 V Spannung
- 0,5 ms Einzelimpulsdauer
- 10 sec. Stimulationsdauer
- 0,5/ 1/ 2/ 4/ 8/ 16 Hz Stimulationsfrequenz.

Zwischen den einzelnen Stimulationen wurde jeweils 2 min. pausiert, zwischen den Stimulationen mit 4 und 8 Hz bzw. 8 und 16 Hz wurde 3 min. abgewartet. Nach Beendigung einer dieser Stimulationsabläufe wurde das System mehrmals gespült und folgende Zeitabstände zur nächsten Stimulationsperiode eingehalten:

Zwischen erster und zweiter EFS 25 min. und zwischen zweiter und dritter EFS 45 min.

In den Pausen wurde das System mehrmals mit Krebs-Ringer-Puffer gespült und vor Beginn der nächsten Stimulation wird je nach Inkubationszeit der zugegebenen Substanz, mindestens jedoch 10 min. vorher das letzte Mal gespült.

#### 2.2.2.2 Exogen zugegebene Peptide

Bei diesen Versuchsreihen wurde nach Prästimulation mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) und Erreichen eines stabilen Kontraktionsplateaus dem Organbad ANP oder VIP in aufsteigenden Konzentrationen kumulativ zugegeben und die jeweils erzielte Inhibition drei Minuten nach der Zugabe gemessen. Die Werte wurden als % Kontraktion bezogen auf das Ausgangsplateau angegeben.

Im Gegensatz zu dem Ablauf bei der EFS ist eine mehrmalig aufeinanderfolgende Peptidapplikation am selben Streifen nicht möglich, da dabei keine vergleichbaren Inhibitionswerte erreicht werden.

#### 2.2.2.3 NO-Donor DEA-NO

Bei den Versuchsreihen mit DEA-NO wurde ebenfalls mit Serotonin vorstimuliert und die Substanz kumulativ nach Erreichen eines stabilen Plateaus dem Organbad zugegeben und die erzielte Inhibition zwei Minuten nach Zugabe gemessen und als % Kontraktion, bezogen auf das Ausgangsplateau, angegeben.

Auch bei der durch den NO-Donor DEA-NO erzielten Inhibitionen ist es nötig, den Effekt verschiedener Substanzen gegenüber Kontrollversuchen an anderen Streifen aus dem Versuch zu beurteilen, da auch hier bei mehrmalig aufeinanderfolgender Applikation erheblich unterschiedliche Inhibitionswerte erzielt werden.

#### 2.2.2.4 Einfluß verschiedener Blocker auf die inhibitorischen Stimuli

Der Blocker der m-Cholinorezeptoren Atropin ( $10^{-6}$  [mol/l]) und der adrenerge Blocker Guanethidin ( $10^{-6}$  [mol/l]) wurden dem Puffer bereits vor Beginn der Äquilierungsperiode zugegeben und wurden somit mindestens 30 min. inkubiert.

Der Blocker neuronaler Übertragung Tetrodotoxin (TTX) ( $10^{-6}$  [mol/l]), der Inhibitor der NO-Synthase N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA) ( $10^{-4}$  [mol/l]), L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) sowie der Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase  $^1\text{H}$ -[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) ( $10^{-5}$  [mol/l]) wurden 10 min. inkubiert. Der Inhibitor der Proteinkinase A KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]), der Inhibitor der cGMP spezifischen Phosphodiesterase III Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]), der Inhibitor der cGMP spezifischen Phosphodiesterase V Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) sowie der Kaliumkanalblocker Apamin ( $10^{-6}$  [mol/l]) wurden 15 min. vor Versuchsbeginn dem System zugegeben.

Das Lösungsmedium der jeweiligen Substanz wurde parallel zur Versuchsreihe als Kontrolle dem Organbad zugegeben.

#### 2.2.3 Geräte und Chemikalien

Es wurden zur Datenaquisition folgende Geräte verwendet:

Kraftwandler: Swegma Force Displacement Transducer SG 4-500, Swegma, Schweden und Grass Force Transducer FT 04, Grass, USA. Verstärker: Transbridge TBM 4, Transbridge, USA. Schreiber: Rikadenki, Finnland. Stimulator Grass, USA.

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

VIP: Bachem Biochemica, Heidelberg, Deutschland

Trequinsin: Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA, USA

KT 5720: Biomol Feinchemikalien, Hamburg, Deutschland

Zaprinast, ODQ: Tocris, Ballwin, MO, USA

Apamin, L-Arginin, Serotonin, Guanethidin, Atropin, L-NNA: Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA

Diethylamine-nitric oxide complex (DEA-NO): RBI Research Biochemicals International, Natrick, MA, USA

ANP: Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, CA, USA

Stock solutions von ODQ, Zaprinast, KT 5720, wurden in DMSO, die übrigen Substanzen in 4°C kaltem, entmineralisiertem Wasser hergestellt. ANP, VIP und Apamin wurde beim Lösen 1 % Humanalbumin zugesetzt. Beim Lösen von L-NNA wurde 1 N HCl bis zum vollständigen Lösen hinzutitriert.

Die Substanzen wurden dann am jeweiligen Versuchstag in 4°C kaltem entmineralisiertem Wasser weiterverdünnt und während des Versuchs im Kühlschrank aufbewahrt.

Bei den Versuchen wurde bei Kontrollen das jeweilige Lösungsmedium in gleicher Konzentration zugegeben.

### 2.3 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die Fallzahl der zur Auswertung verwendeten Muskelstreifen ist durch n gekennzeichnet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Es wurden zur statistischen Auswertung der Student-t-Test für unverbundene Stichproben sowie die Varianzanalyse für wiederholte Messungen (One way ANOVA) verwendet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Basalaktivität

Die Muskelstreifen zeigen nach dem Einbringen in das Organbad und Anlegen einer Vorspannung von 1 g umgehend eine Spontanaktivität. Unter Standardbedingungen (37°C, Begasung mit Carbogen) treten ohne Prästimulation mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) tonische Kontraktionen mit einer mittleren Frequenz von 1,5 /min. ( $\pm 0,2$ ) auf. Die Kontraktionen nehmen bei Temperaturerhöhung an Frequenz und Amplitude zu. Nach Hinzufügen eines 20°C warmen Puffers tritt eine kurzanhaltende (ca. 1 min.), reproduzierbare Kontraktion auf, die nach Erwärmung des Organbades beendet ist.

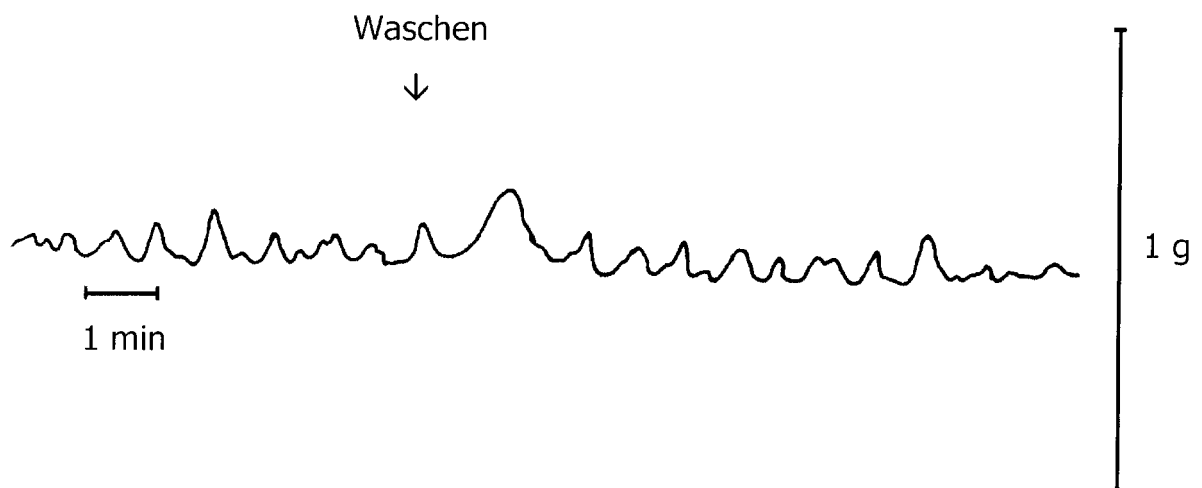


Abb.2: Basalaktivität eines Muskelstreifen aus dem Magenfundus im 37 °C warmen Organbad und der Einfluß eines Pufferwechsels (20 °C) auf die Basalaktivität (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).

#### 3.2 Isometrische bzw. auxotonische Kontraktion

Nach Stimulation des Muskelstreifens mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) zeigt sich eine unterschiedliche Kontraktion abhängig davon, ob die Kontraktionen isometrisch oder auxotonisch aufgezeichnet werden.

### 3.2.1 Isometrische Kontraktion

Bei einer Befestigung des Muskelstreifens direkt am Kraftwandler ist davon auszugehen, daß für den Muskelstreifen keine reale Verkürzungsmöglichkeit besteht. Bei Stimulation mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) kommt es somit zu einer isometrischen Kontraktion, d.h. einer Kraftänderung ohne Längenänderung des Muskels.

Dabei ergibt sich ein charakteristisches Kontraktionsmuster, das durch eine schnelle Tonuserhöhung, gefolgt von einem relativ schnellen Tonusabfall, gekennzeichnet ist.

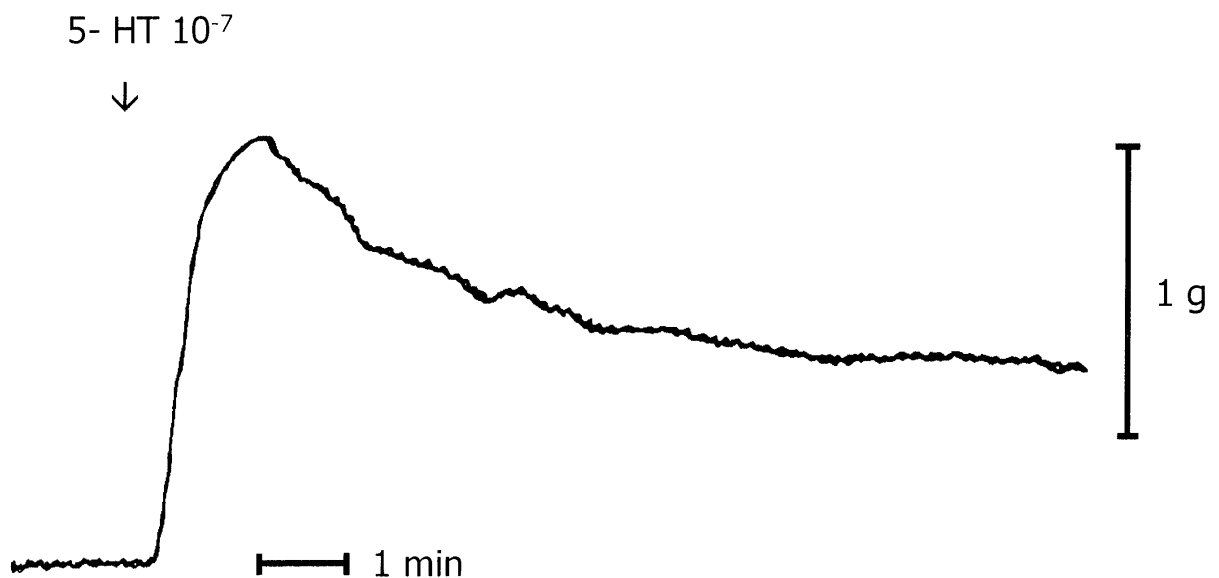


Abb.3: Einfluß von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die Basalaktivität eines Muskelstreifens im Zeitverlauf unter Standardbedingungen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe, (Originalaufzeichnung der isometrisch gemessenen Tonusänderungen).

### 3.2.2 Auxotonische Kontraktion

Ein grundsätzlich anderes Bild ergibt sich, wenn zwischen dem Muskelstreifen und Kraftwandler eine Silberfeder ( $D=1\text{g/cm}$ ) eingespannt wird. Diese ermöglicht es dem Magenstreifen, sich real zu verkürzen. Somit wandelt sich

die vorher isometrische Kontraktion in eine auxotonische um. Von einer reinen isotonischen Kontraktion, d.h. einer Längenänderung ohne Kraftänderung kann deshalb nicht gesprochen werden, da der dem Muskel entgegenstehende Widerstand nicht konstant ist, sondern sich bei Zunahme der Verkürzung bzw. Dehnung der Feder erhöht.

Somit liegt eine Mischform zwischen isometrischer und isotonischer, eine sogenannte auxotonische Kontraktion vor.

Hiebei zeigt sich, daß die serotonininduzierten Kontraktionen nach der initialen Tonuserhöhung von einem wesentlich langsameren Plateaubabfall geprägt sind. Die so erzeugten Kontraktionen bleiben bis zu 45 min. und länger auf einem stabilen Niveau.

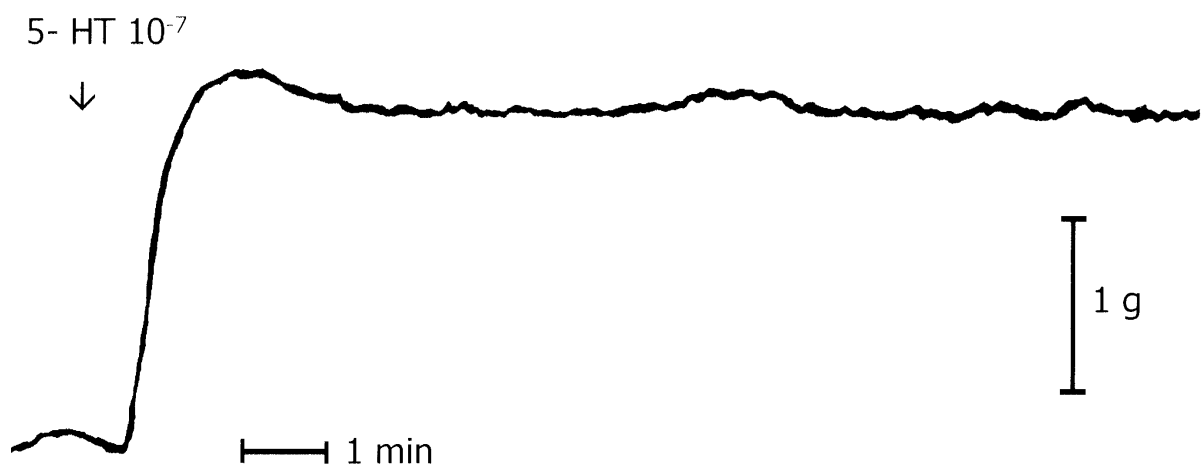


Abb.4: Einfluß von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die auxotonisch aufgezeichnete Kontraktion eines Muskelstreifens im Zeitverlauf (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).



### 3.3 Konzentrationsabhängige Kontraktion nach Serotoninzugabe

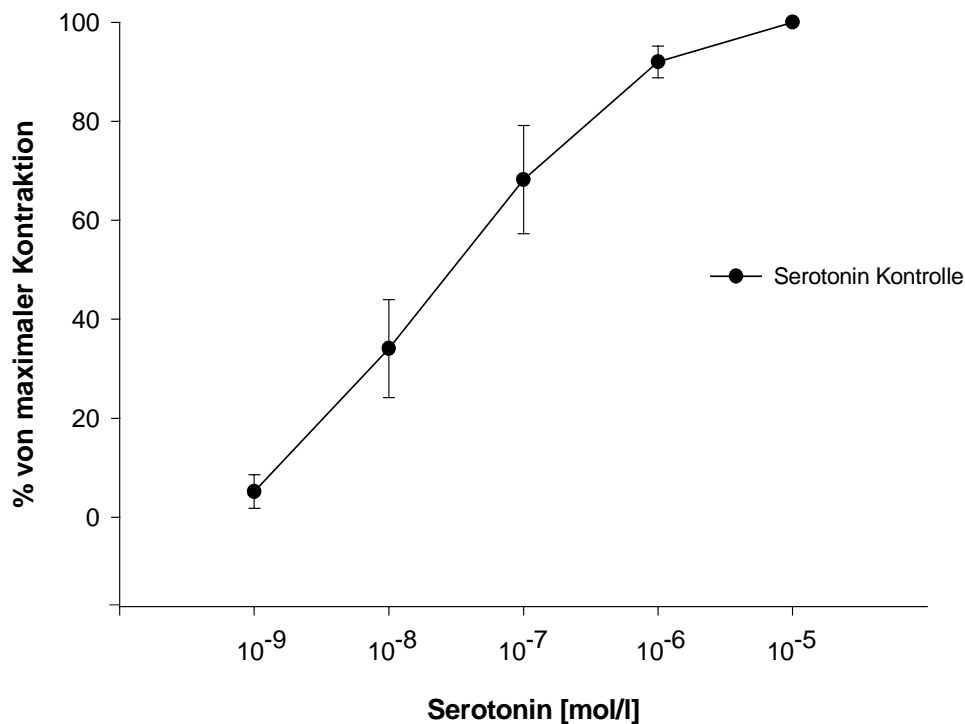


Abb.5: Einfluß von Serotonin auf die Kontraktionskraft der Muskelstreifen. Die auxotonisch aufgezeichneten Kontraktionen erreichten nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-5}$  [mol/l]) eine maximale Kontraktion. Nach Zugabe von Serotonin wurde jeweils nach zwei Minuten die Kontraktion bestimmt und auf die maximal mögliche Kontraktion bezogen (n=6).

Nach Zugabe von Serotonin kontrahieren sich die Muskelstreifen konzentrationsabhängig mit einer maximalen Kontraktion nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-5}$  [mol/l]). Nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-5}$  [mol/l]) lassen sich die Muskelstreifen auch nach mehrmaligem Waschen kein weiteres Mal stimulieren.

Durch Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) kontrahieren sich die Muskelstreifen submaximal, reversibel und mit konstanter Amplitude, weswegen diese Konzentration zur Prästimulation der Muskelstreifen verwendet wurde, um den Einfluß inhibitorischer Stimuli besser beurteilen zu können.

Nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) zeigt sich innerhalb von ca. 20 sec. ein Anstieg des Tonus des Muskelstreifens, der sich nach ca. 1-2 min. auf ein

konstantes Plateau einstellt und bei Aufzeichnung auxotonischer Kontraktionen länger als 45 min. dort verbleibt.

### 3.4 Stabilität des Serotonin-induzierten Plateaus

Voraussetzung für eine Untersuchung und Quantifizierung von inhibitorischen Einflüssen auf den prästimulierten Muskelstreifen ist die Tatsache, daß das serotonininduzierte Plateau in dem Zeitfenster, in dem gemessen wird, konstant ist, so daß ausgeschlossen werden kann, daß eine Änderung des Tonus allein aus einer spontanen Tonusänderung resultiert, sondern aufgrund der Applikation inhibitorischer Stimuli zustande kommt.

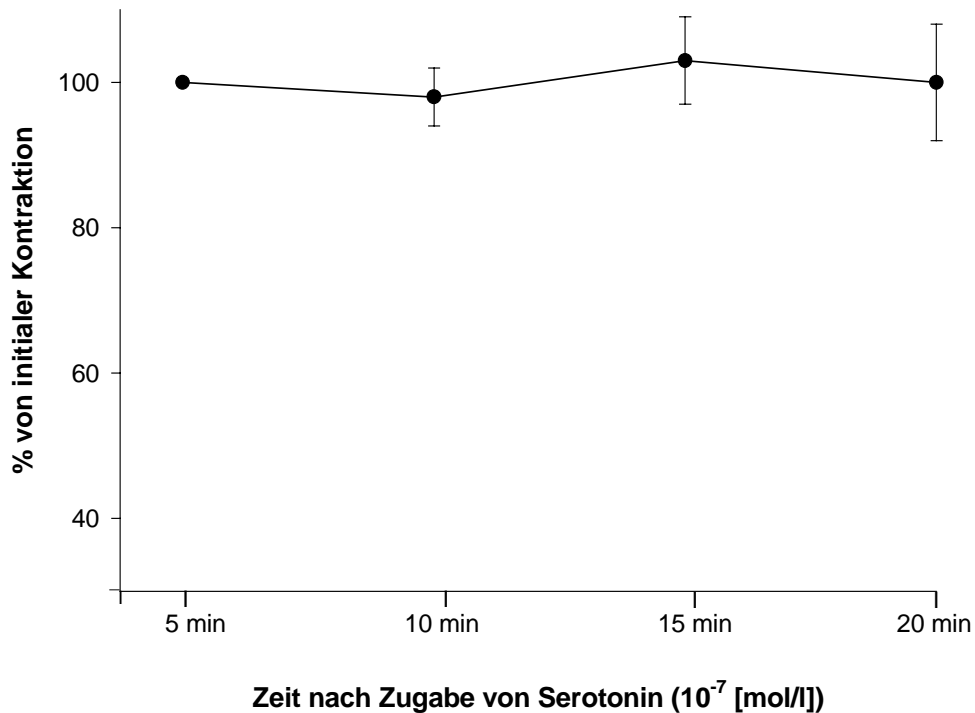


Abb.6: Stabilität der Serotonin-induzierten, auxotonisch aufgezeichneten Kontraktion der Muskelstreifen im Zeitverlauf. Die initiale Kontraktion wurde 5 min. nach Serotoninzugabe bestimmt und als Bezugspunkt definiert (n=8).

### 3.5 Einfluß von Elektrischer Feldstimulation (EFS) auf den Muskelstreifen

Wie bereits beschrieben wurde über zwei zirkuläre Stimulationselektroden, die an den Streifenenden platziert wurden, der Muskelstreifen durch Erzeugung eines elektrischen Feldes stimuliert und eine Freisetzung von Neurotransmittern bewirkt. Eine elektrische Feldstimulation in Abwesenheit von Atropin und Guanethidin führt sowohl auf den Basaltonus als auch auf das prästimulierte Plateau zu einer frequenzabhängigen Kontraktion, bei der im Bereich von (4), 8, 16 und 32 Hz zusätzlich eine nachfolgende, verzögert eintretende Relaxation beobachtet werden kann.

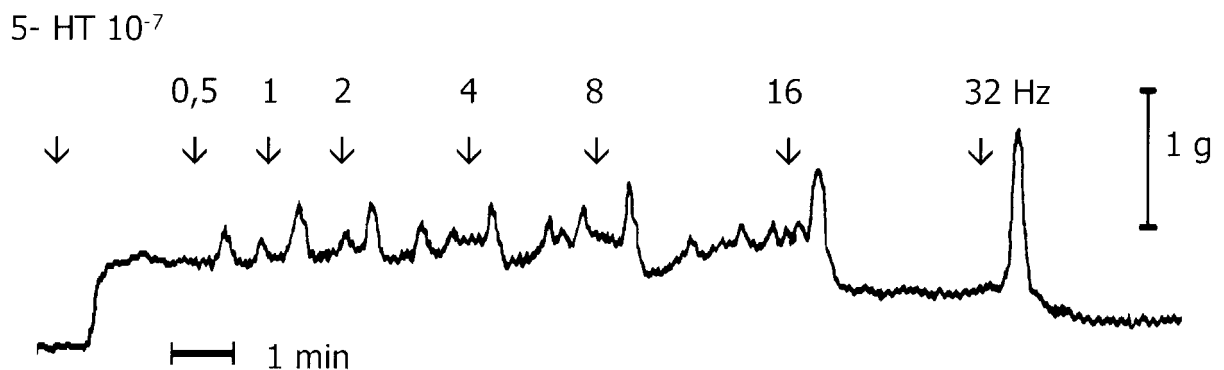


Abb.7: Einfluß von elektrischer Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) auf den mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) prästimulierten Muskelstreifen in Abwesenheit von Atropin und Guanethidin. Der Zeitpunkt der Serotoninzugabe bzw. der Beginn der elektrischen Feldstimulation (10 sec.) sind mit einem Pfeil markiert (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).

#### 3.5.1 Einfluß von Atropin und Guanethidin auf die EFS

Unter Einfluß von Atropin ( $10^{-6}$  [mol/l]), das die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren blockiert, beobachtet man unter gleichen Bedingungen das Verschwinden des kontraktiven Effektes und eine deutliche Verstärkung der Relaxation bei allen Stimulationsfrequenzen. Der durch Atropin hervorgerufene

Effekt lässt sich auch nach mehrmaligem Waschen über 1 h nicht mehr beseitigen.

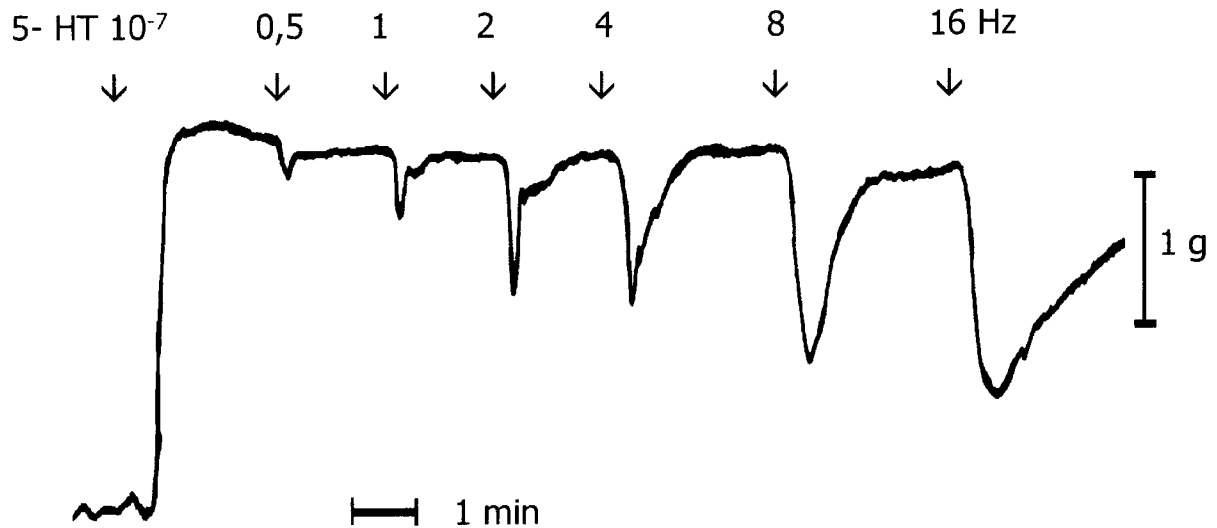


Abb.8: Einfluß von Atropin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) des Muskelstreifens (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).

Bei den Kontrollstimulationen ergab sich bei einer zeitlich differenzierten Auswertung, die im weiteren besprochen werden wird, folgende Frequenz-Wirkungs-Beziehung:

Stimulationsfrequenz	0,5 Hz	1 Hz	2 Hz	4 Hz	8 Hz	16 Hz
% Inhibition (nach 20 sec.)	$8 \pm 4 \%$	$33 \pm 4 \%$	$59 \pm 5 \%$	$69 \pm 6 \%$	$82 \pm 5 \%$	$95 \pm 3 \%$
% Inhibition (nach 1 min.)	$6 \pm 3 \%$	$15 \pm 3 \%$	$25 \pm 4 \%$	$36 \pm 5 \%$	$61 \pm 5 \%$	$91 \pm 3 \%$

Tab.1: Frequenz-Wirkungs-Beziehung bei der EFS. Die 30 sec. bzw. 1 min. nach Stimulationsbeginn gemessenen Werte sind als % Inhibition, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) angegeben.

Die Anwesenheit von Guanethidin ( $10^{-6}$  [mol/l]), das eine Entleerung der adrenergen Speicher bewirkt, zeigte zu keinem Zeitpunkt einen direkt messbaren Effekt auf die elektrische Feldstimulation, wurde jedoch in sämtlichen Versuchen dem Puffer zugegeben, um lediglich nicht-adrenerg nicht-cholinerg (NANC) vermittelte Effekte zu untersuchen.

### 3.5.2 Elektrische Feldstimulation unter NANC-Bedingungen

Das Ausmaß der durch Feldstimulation induzierten Relaxation ist bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen und -dauern unterschiedlich.

Die erzielten Relaxationen werden als Prozent Plateauänderung bezogen auf die Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) induzierte Kontraktion angegeben.

Im gesamten Frequenzbereich von 0,5 -16 Hz setzt die Relaxation sofort nach Stimulationsbeginn ein, der Tonus des Streifens kehrt bei Stimulationsfrequenzen von 0,5 - 4 Hz nach Stimulationsende schnell, d.h. innerhalb einer Minute auf das Ausgangsniveau zurück. Diese schnell einsetzende kurz anhaltende Relaxation wird sehr wahrscheinlich vorwiegend durch eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt<sup>10</sup>(S. 444).

Bei einer höherfrequenten Stimulation mit 8 -16 Hz setzt die Relaxation weiterhin schnell ein, jedoch ist sie dauerhafter und der Ausgangstonus wird erst langsam, d.h. erst nach über einer Minute wieder erreicht. Die schnell einsetzende Komponente der Relaxation ist wohl wiederum auf eine NO Freisetzung zurückzuführen<sup>12</sup>(S. 112), während die verzögerte, länger anhaltende Relaxation wohl hauptsächlich über eine Peptidfreisetzung (unter anderem VIP) vermittelt wird<sup>29</sup>(S. 174),<sup>30</sup>(S. 711).

Dem unterschiedlichen Charakter der Relaxation in Abhängigkeit vom Frequenzbereich wurde mit einer zeitlich differenzierten Auswertung versucht Rechnung zu tragen. So wurde die Relaxation 20 sec. und 1 min. nach Stimulationsbeginn bestimmt, um den schnell (nach 20 sec.) einsetzenden Effekt von dem bei hochfrequenten Stimulationen auftretenden, verzögert einsetzenden (1 min.) relaxierenden Effekt abzugrenzen.

Durch diese Unterscheidung soll eine tendentielle Abgrenzung von schnell einsetzenden, wohl NO vermittelten und verzögert einsetzenden, wohl peptiderg vermittelten Effekten getroffen werden.

<b>Geschwindigkeit</b>	<b>Schnelle Antwort</b>	<b>Verzögerte Antwort</b>
Auswertung nach	20 sec.	1 min.
Vorhanden im Frequenzbereich von	0,5-16 Hz	8-16 Hz
Dominierender Neurotransmitter	NO	Peptide (u.a. VIP)

Der Effekt von elektrischer Feldstimulation auf den mit Serotonin vorstimulierten Muskelstreifen bei einer Stimulation mit 2 Hz ist im folgenden dargestellt:

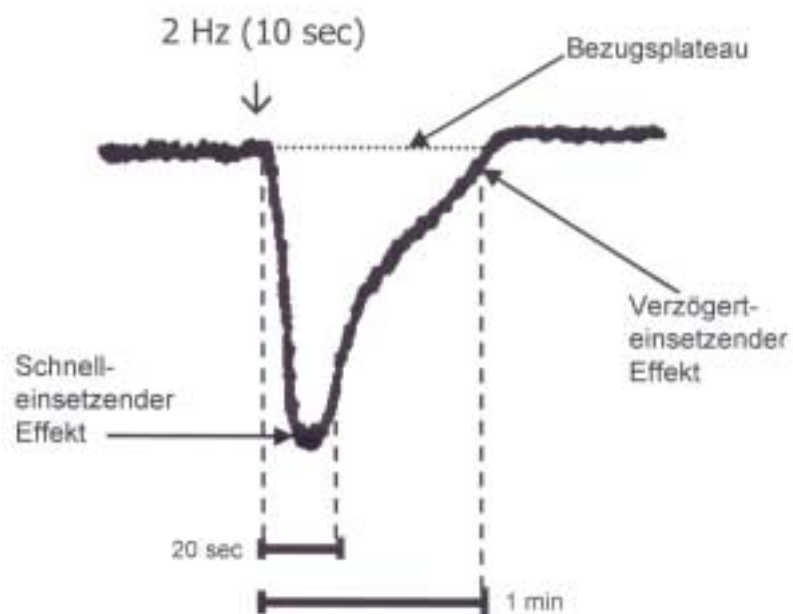


Abb.9: Originalkurve einer Stimulation mit 2 Hz mit den für die Auswertung wichtigen Bezugspunkten. Zur Differenzierung der schnell und verzögert einsetzenden Effekten wurde die Relaxation 20 sec. und 1 min. nach Stimulationsende bestimmt.

Bei einer höherfrequenten Stimulation mit z.B. 8 Hz ist neben der schnell einsetzenden kurzdauernden Relaxation zusätzlich eine verzögert einsetzende, länger anhaltende Relaxation beteiligt, die durch eine Bestimmung der Relaxation nach 1 min. deutlicher dargestellt werden kann.

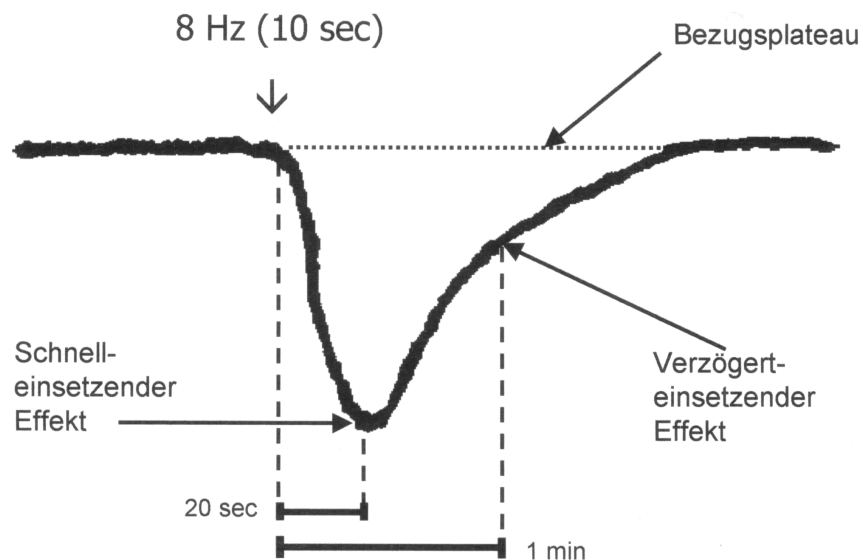


Abb.10: Originalkurve einer Stimulation mit 8 Hz mit den für die Auswertung wichtigen Bezugspunkten. Zur Differenzierung der schnell und verzögert einsetzenden Effekten wurde die Relaxation 20 sec. und 1 min. nach Stimulationsende bestimmt.

Bei der Auswertung der Relaxation 20 sec. und 1 min. nach Stimulationsende zeigt sich, daß der Anteil der schnell einsetzenden Relaxation (Auswertung nach 20 sec.) über den gesamten Frequenzbereich kontinuierlich ansteigt und im Frequenzbereich von 0,5-4 Hz fast alleine für die Relaxation sorgt. Demgegenüber tritt die verzögert einsetzende Relaxation (Auswertung nach 1 min.) erst ab (4) 8-16 Hz auf und bewirkt dann eine deutlich länger anhaltende Relaxation des Muskelstreifen.

Das Ausmaß der zeitlich differenziert bestimmten Relaxationen ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

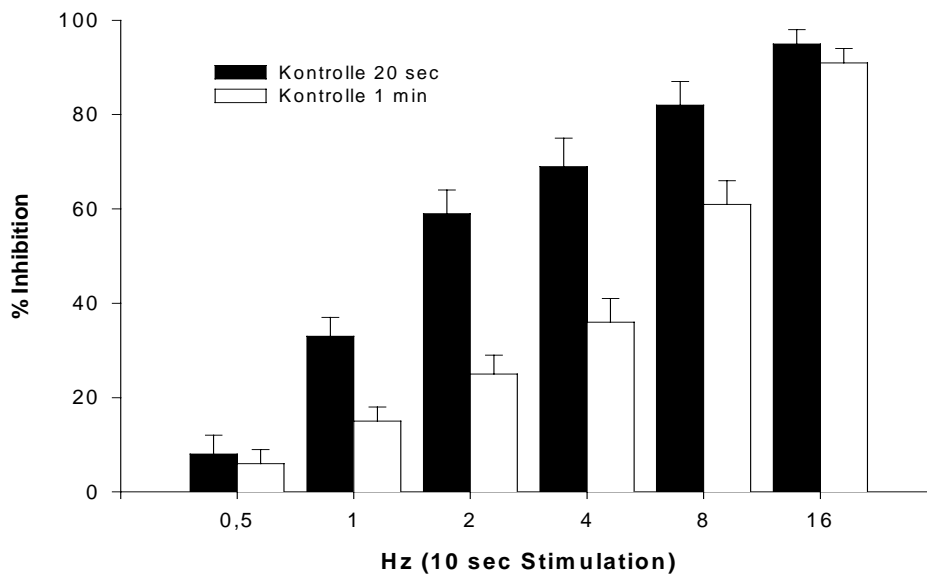


Abb.11: Bild der zeitlich differenzierten Auswertung nach 20 sec. und 1 min. bei der EFS (10 sec. Stimulation). Die EFS induzierte Relaxation ist als % Tonusabfall bezogen auf das Ausgangsplateau nach Serotoninzugabe angegeben (% Inhibition).

### 3.6 Auswertung

#### 3.6.1 Versuchsablauf EFS

Bei der elektrischen Feldstimulation wurden an einem Streifen bis zu drei aufeinanderfolgende Stimulationen durchgeführt. Dabei wurden bei den einzelnen Stimulationsabfolgen Werte erzielt, die eine statistische Auswertung im Sinne einer Varianzanalyse möglich macht.

Bei der Auswertung nach 20 sec. entstand kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Stimulationen, die erzielten Inhibitionswerte waren in allen Frequenzbereichen innerhalb des Konfidenzintervalls.

Lediglich bei der Auswertung nach 1 min. zeigt sich bei der Stimulation mit 16 Hz ein signifikanter Unterschied zwischen der ersten und zweiten und zwischen zweiter und dritter EFS, was bei der Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt wurde.



### 3.6.2 Versuchsablauf Peptide

Bei den Versuchsreihen, bei denen der Einfluß von den Peptiden VIP und ANP untersucht wurde, wurden kumulative Dosis-Wirkungsbeziehungen erstellt, d.h. das Peptid wurde in aufsteigender Konzentration dem einmal prästimulierten Muskelstreifen zugegeben, und die Relaxation in Bezug zum Ausgangsplateau für die einzelnen Konzentrationen bestimmt. Mit der Peptidzugabe wurde begonnen, sobald sich ein stabiles Kontraktionsplateau nach Serotoninzugabe eingestellt hatte.

Bei der Applikation von VIP ergibt sich folgendes Bild:

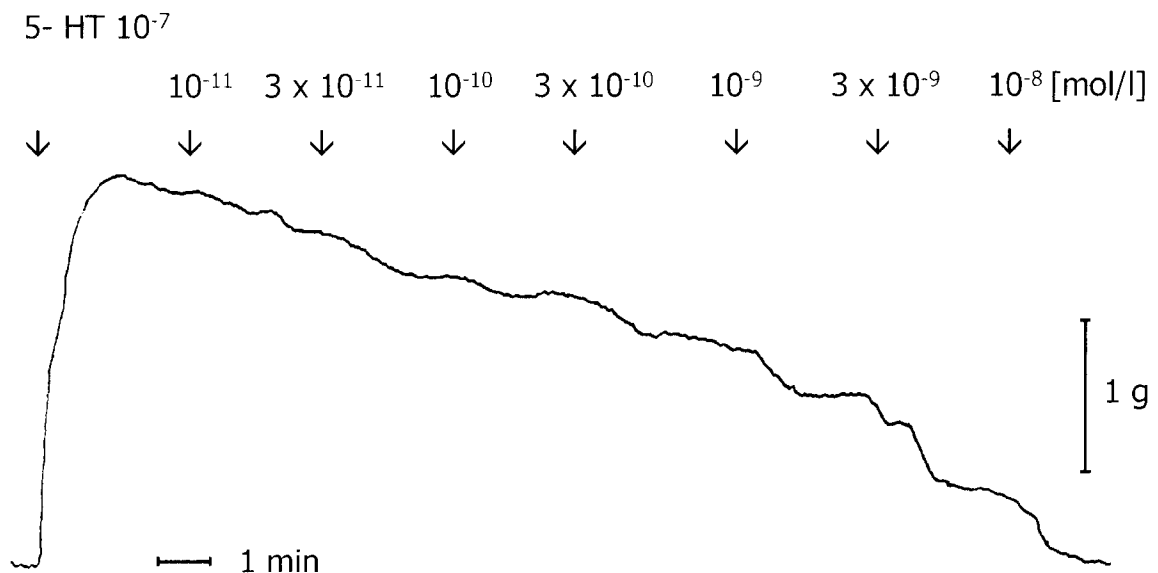


Abb.12: Einfluß von VIP auf den mit Serotonin prästimulierten Muskelstreifen (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Konzentrationsangaben bezeichnen die im Organbad vorhandene VIP Konzentration.

Bei den Kontrollversuchen ergab sich für VIP folgende Dosis-Wirkungs-Beziehung:

Konzentration VIP [mol/l]	$10^{-11}$	$3 \times 10^{-11}$	$10^{-10}$	$3 \times 10^{-10}$	$10^{-9}$	$3 \times 10^{-9}$	$10^{-8}$
% Kontraktion	$80 \pm 2\%$	$60 \pm 3\%$	$46 \pm 4\%$	$29 \pm 4\%$	$14 \pm 3\%$	$6 \pm 3\%$	$1 \pm 1\%$

Tab.2: Dosis-Wirkungs-Beziehung von VIP. Die 3 min. nach Peptidzugabe gemessenen Werte sind als % Kontraktion, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) bezogen.

Nach der Zugabe von VIP in der Konzentration von  $10^{-8}$  [mol/l] wurde in allen Fällen eine Inhibition von 100% erzielt.

Nach der Durchführung einer derartigen VIP-Applikation läßt sich an dem Muskelstreifen auch nach mehrmaligem Waschen und langer Wartezeit (> 45 min.) keine vergleichbare Kontraktion mehr erreichen, so daß eine mehrmalige Peptidapplikation am selben Streifen nicht möglich ist.

Bei der ebenfalls kumulativ erstellten Dosis-Wirkungsbeziehung von ANP zeigt sich folgendes Bild:

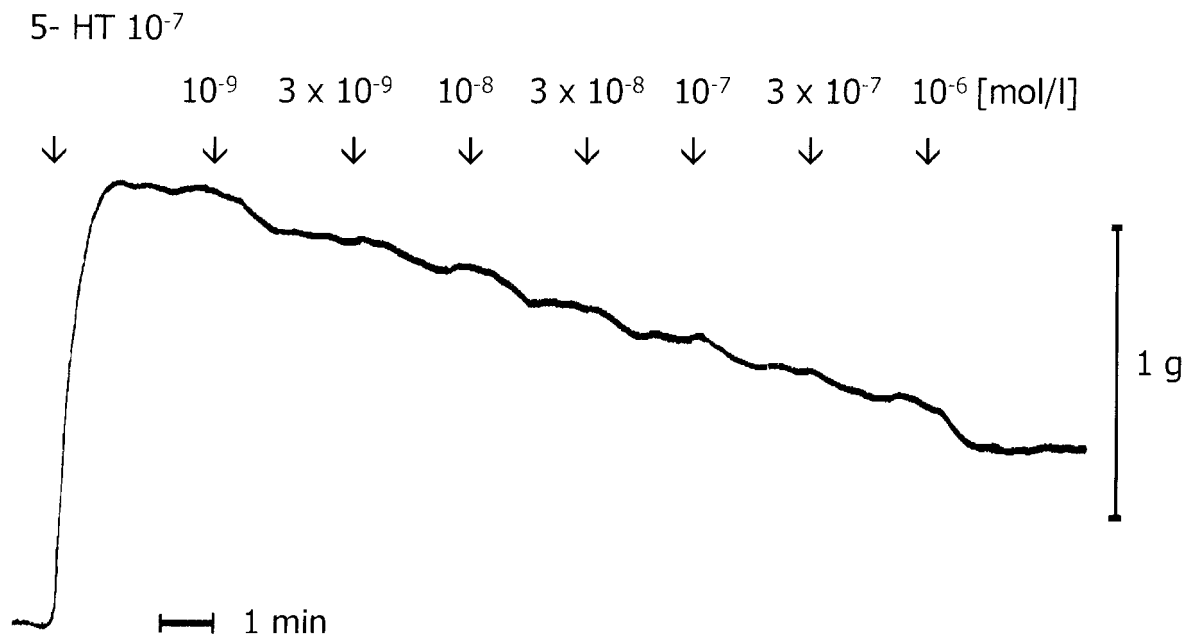


Abb.13: Einfluß von ANP auf den Serotonin prästimulierten Muskelstreifen (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Konzentrationsangaben bezeichnen die im Organbad vorhandene ANP-Konzentration.

Bei den Kontrollversuchen ergab sich für ANP die folgende Dosis-Wirkungs-Beziehung:

Konzentration ANP [mol/l]	$10^{-9}$	$3 \times 10^{-9}$	$10^{-8}$	$3 \times 10^{-8}$	$10^{-7}$	$3 \times 10^{-7}$	$10^{-6}$
% Kontraktion	90±1%	84±1%	77±2%	72±2%	65±2%	58±2%	53±3%

Tab.3: Dosis-Wirkungs-Beziehung von ANP. Die 3 min. nach Peptidzugabe gemessenen Werte sind als % Kontraktion, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) bezogen.

Durch die Zugabe von ANP läßt sich keine Inhibition von 100% erzielen, sondern es ergibt sich nach der Zugabe von  $10^{-6}$  [mol/l] eine maximale Inhibition von 53±3%. Dies ist die maximal erreichbare und finanzierbare Konzentration von ANP im Organbad.

Auch bei der ANP-induzierten Relaxation lassen sich keine aufeinanderfolgenden Peptidapplikationen durchführen, da zwar eine weitere Stimulation mit Serotonin und eine Relaxation durch ANP möglich ist, die Inhibitionswerte jedoch zu unterschiedlich sind, um miteinander in statistischen Bezug gebracht zu werden.

Bei den durch Peptide vermittelten Relaxationen handelt es sich um relativ langsam einsetzende, länger andauernde Tonusänderungen. Für die Erfassung der durch die einzelnen Peptidkonzentrationen induzierten Relaxationswerte hat sich ein Intervall von 3 min. nach Peptidzugabe als geeignet erwiesen, da sich nach dieser Zeit in den allermeisten Fällen wieder ein stabiles Plateau eingestellt hatte.

Auch hier wurden die Relaxationen als % Plateauänderung bezogen auf das durch Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) hervorgerufene Plateau angegeben.

Als Kontrollgruppen wurden daher in jedem Versuch mehrere Muskelstreifen verwendet, bei denen die gleichen Versuchsbedingungen herrschten, und auf die die Ergebnisse der mit spezifischen Blockern behandelten Streifen bezogen wurden. Diese wurden statistisch mit dem t-Test für unverbundene Stichproben ausgewertet.

### 3.6.3 Versuchsablauf DEA-NO

Die Zugabe des NO freisetzenden DEA-NO (Diäthyl-Amin-NO) auf den Serotonin-prästimulierten Muskelstreifen führte ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation in der dargestellten Form:

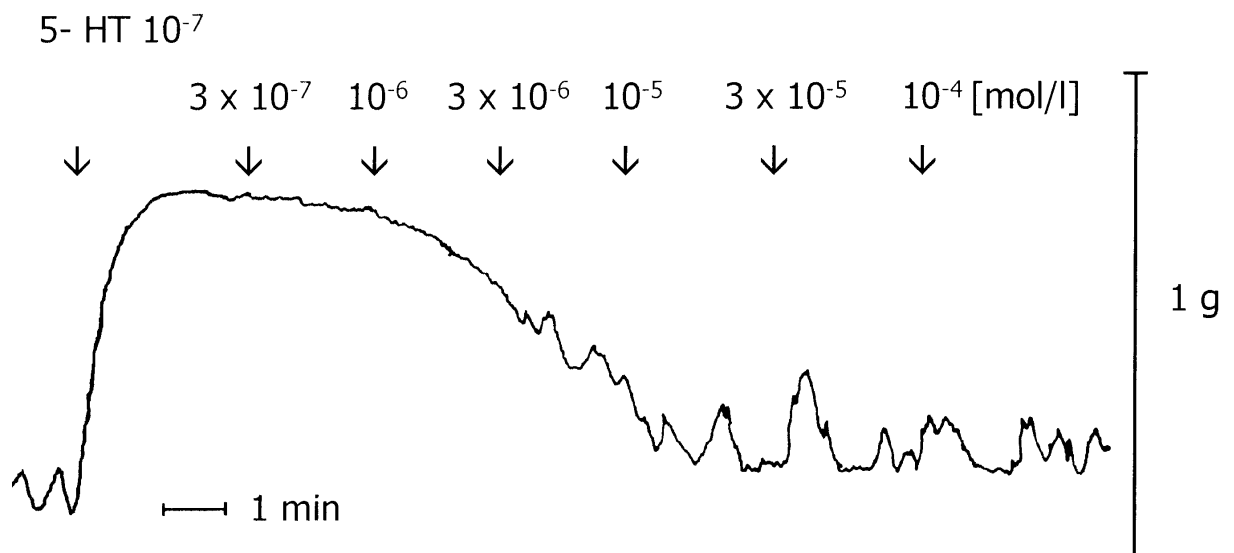


Abb.14: Einfluß von DEA-NO auf den Serotonin prästimulierten Muskelstreifen (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Konzentrationsangaben bezeichnen die im Organbad vorhandene DEA-NO Konzentration.

Bei den Kontrollversuchen ergab sich für DEA-NO die folgende Dosis-Wirkungs-Beziehung:

Konzentration DEA-NO [mol/l]	$3 \times 10^{-7}$	$10^{-6}$	$3 \times 10^{-6}$	$10^{-5}$	$3 \times 10^{-5}$	$10^{-4}$
% Kontraktion	96±1%	83±3%	53±7%	21±6%	7±3%	4±3%

Tab.4: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DEA-NO. Die 3 min. nach Peptidzugabe gemessenen Werte sind als % Kontraktion, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) bezogen.

Auch bei der Untersuchung des inhibitorischen Einflusses von Diäthyl-Amin-NO (DEA-NO) wurden kumulative Dosis-Wirkungs-Beziehungen erstellt. Die erzielten Tonusänderungen wurden 1 min. nach Zugabe der entsprechenden Konzentration von DEA-NO, das alle zwei Minuten in der nächsthöheren Konzentration zugegeben wurde, bestimmt und als prozentuale Relaxation bezogen auf das Ausgangsplateau angegeben.

Jedoch ist es auch bei der DEA-NO induzierten Relaxation nötig, als Kontrolle einen anderen Streifen aus dem gleichen Versuch zu wählen, da bei einer wiederholten Zugabe von DEA-NO am selben Muskelstreifen deutlich unterschiedliche Relaxationswerte erzielt werden. Auch hierbei wurde der t-Test für unverbundene Stichproben zur statistischen Auswertung verwendet.

### 3.7 Einfluß des Blockers neuronaler Übertragung Tetrodotoxin (TTX)

Das vom Kugelfisch isolierte Neurotoxin ist ein potenter Inhibitor der schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle und somit der Fortleitung von Aktionspotentialen. Tetrodotoxin wird hier zur Unterscheidung von neuronal und nicht neuronal vermittelten Effekten verwendet.

Die Zugabe und 10 min. Inkubationszeit von TTX ( $10^{-6}$  [mol/l]) führte dazu, daß die durch EFS induzierte Relaxation im gesamten Frequenzbereich vollständig geblockt wird (in allen Frequenzbereichen  $p < 0.001$ ). Lediglich bei der Stimulation mit 32 Hz bleibt eine stimulationssynchrone Tonuszunahme erhalten.

Die durch EFS induzierte Relaxation wird unter den angewandten Versuchsbedingungen über eine Freisetzung von Neurotransmittern aus Nervenendigungen also neuronal vermittelt.

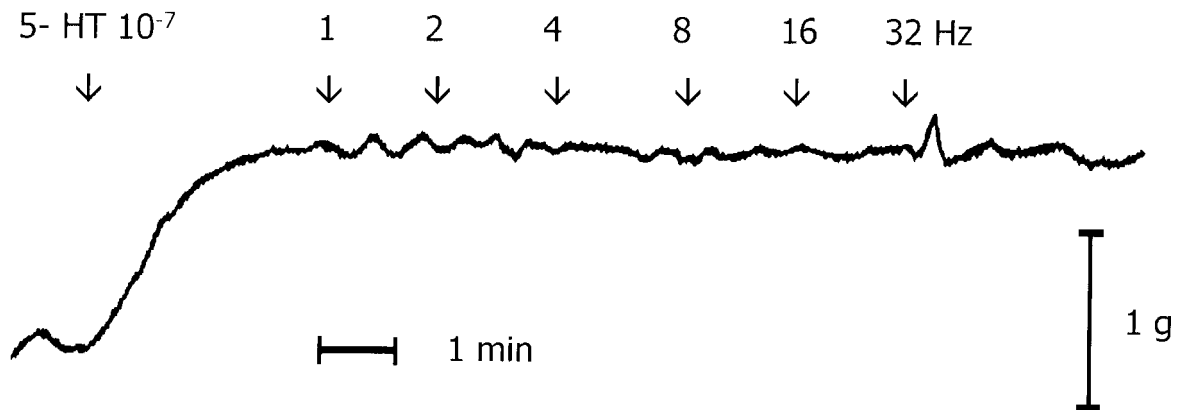


Abb.15: Einfluß von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation ) induzierte Relaxation (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe bzw. den Beginn der elektrischen Feldstimulation.

### 3.8 Einfluß des Inhibitors der NO Synthase N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA)

L-NNA inhibiert kompetitiv und reversibel die NO-Synthase, die durch Abspaltung aus L-Arginin NO freisetzt.

Bei Zugabe der Substanz auf die unstimulierten Muskelstreifen zeigte sich bei einigen Streifen eine Zunahme des Basaltonus, die jedoch schlecht reproduzierbar war. Bei Zugabe auf die mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) vorstimulierten Muskelstreifen zeigte sich 5 min. nach Zugabe eine Zunahme des Tonus um bis zu 7 % Prozent.

Die Aminosäure L-Arginin dient als Substrat für die NO-Synthase und kann so den kompetitiven Inhibitor L-NNA vom katalytischen Zentrum des Enzyms verdrängen und die Wirkung teilweise antagonisieren.

Die Zugabe von L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) auf den unstimulierten Muskelstreifen zeigt keinen meßbaren Effekt.

Am prästimulierten Streifen aber bewirkte die Zugabe von L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) eine Relaxation von max 17 % nach 5 min., die jedoch sehr unregelmäßig vorhanden und schlecht reproduzierbar war.

### 3.8.1 Einfluss auf die EFS

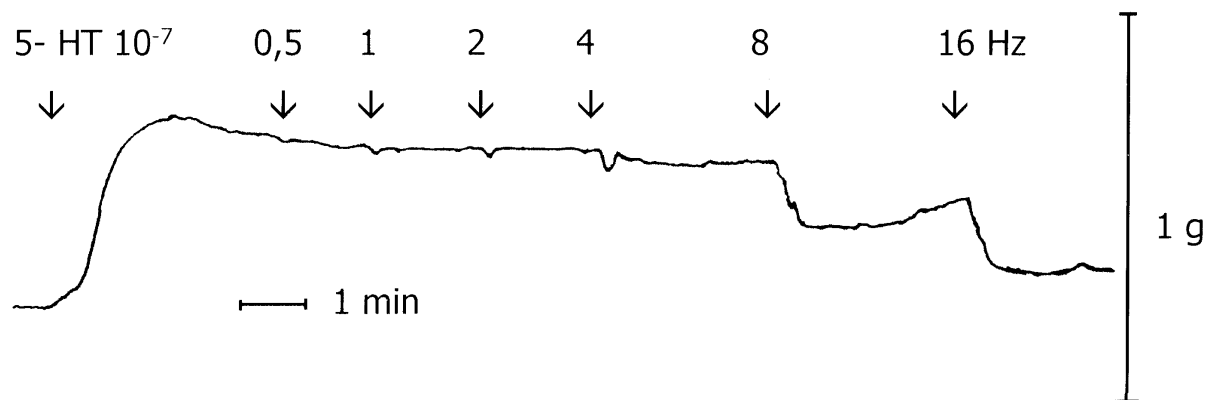


Abb.16: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) induzierte Relaxation (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Das System wurde 10 min. mit L-NNA inkubiert.

Die schnell einsetzende Relaxation (Auswertung nach 20 sec.) wird unter dem Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) im Vergleich zu der Kontrollstimulation signifikant reduziert und zwar im gesamten Frequenzbereich.

Bei Stimulation mit 2 Hz ergab sich eine Reduktion von  $60 \pm 6\%$  auf  $23 \pm 3\%$  ( $p < 0,001$ ) und bei 8 Hz  $84 \pm 5\%$  auf  $67 \pm 5\%$  ( $p < 0,001$ ) ( $n=10$ ).

Bei der Auswertung der verzögert einsetzenden Relaxation (Auswertung nach 1 min.) zeigt sich bei Stimulation mit 8 Hz unter dem Einfluß von N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA) ( $10^{-4}$  [mol/l]) eine Reduktion der Relaxation von  $67 \pm 5\%$  auf  $48 \pm 3\%$ , bei 16 Hz von  $96 \pm 3\%$  auf  $76 \pm 4\%$  ( $n=10$ ) gegenüber der Kontrollstimulation. Diese Reduktion war jeweils signifikant ( $p < 0,001$ ), jedoch zeigt sich bei zwei aufeinanderfolgenden Kontrollstimulationen mit 16 Hz bereits

eine statistisch signifikante Reduktion der erzielten Relaxationen von  $83 \pm 5$  auf  $79 \pm 4\%$  ( $p < 0,006$ ) ( $n=9$ ).

Wird L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) zusammen mit N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA) ( $10^{-4}$  [mol/l]) 10 min. im System inkubiert, so zeigt sich, daß die durch L-NNA hervorgerufene Reduzierung der EFS induzierten Relaxation durch L-Arginin teilweise antagonisiert wird. So wird bei 2 Hz, einem Frequenzbereich, bei dem die Relaxation vorwiegend NO vermittelt wird, durch Zugabe von L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) die Relaxation auf  $44 \pm 5\%$  gegenüber  $23 \pm 3\%$  unter dem Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) verstärkt, bleibt jedoch weiter signifikant unterschiedlich zur Kontrollstimulation ( $p < 0,05$ ).

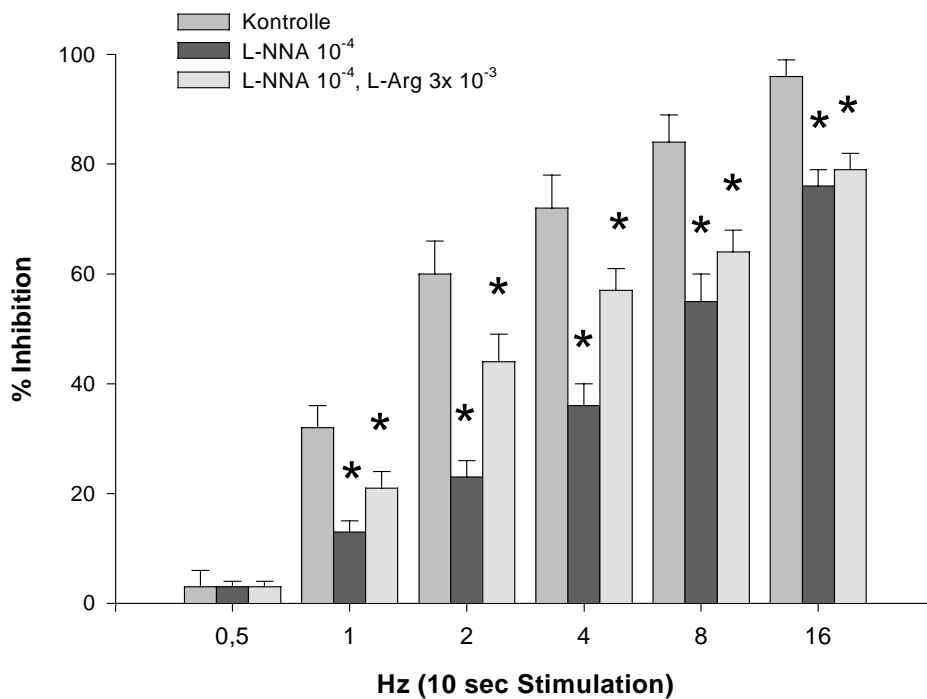


Abb.17: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) und L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. ( $n=10$ ). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.



Bei der Auswertung 20 sec. bzw. 1 min. nach Stimulationsende ergeben sich die aufgeführten Daten:

20 sec.	Kontrolle	L-NNA		L-NNA ( $10^{-4}$ [mol/l])	
	(n=30)	( $10^{-4}$ [mol/l])	(n=10)	L-Arg ( $3 \times 10^{-3}$ [mol/l])	(n=10)
Stimulationsfrequenz	% Inhibition	% Inhibition		% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	8 ± 4 %	3 ± 1%	p = 0.049	3 ± 1 %	p = 0.049
<b>1 Hz</b>	33 ± 4 %	13 ± 2 %	<b>p &lt; 0,001</b>	21 ± 3 %	<b>p &lt; 0,05</b>
<b>2 Hz</b>	59 ± 5 %	23 ± 3 %	<b>p &lt; 0,001</b>	44 ± 5 %	<b>p &lt; 0,05</b>
<b>4 Hz</b>	69 ± 6 %	36 ± 4 %	<b>p &lt; 0,001</b>	57 ± 4 %	<b>p &lt; 0,05</b>
<b>8 Hz</b>	82 ± 5 %	55 ± 5 %	<b>p &lt; 0,001</b>	64 ± 4 %	<b>p &lt; 0,05</b>
<b>16 Hz</b>	95 ± 3 %	76 ± 3 %	<b>p &lt; 0,001</b>	79 ± 3 %	<b>p &lt; 0,05</b>

1 min.	Kontrolle	L-NNA		L-NNA ( $10^{-4}$ [mol/l])	
	(n=30)	( $10^{-4}$ [mol/l])	(n=10)	L-Arg ( $3 \times 10^{-3}$ [mol/l])	(n=10)
Stimulationsfrequenz	% Inhibition	% Inhibition		% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	6 ± 3 %	6 ± 2 %	p = 0.728	6 ± 3 %	p = 0.728
<b>1 Hz</b>	15 ± 3 %	12 ± 3 %	p = 0.202	15 ± 3 %	p = 0.183
<b>2 Hz</b>	25 ± 4 %	21 ± 3 %	p = 0.368	26 ± 4 %	p = 0.156
<b>4 Hz</b>	36 ± 5 %	31 ± 3 %	p = 0.461	33 ± 4 %	p = 0.259
<b>8 Hz</b>	61 ± 5 %	48 ± 3 %	<b>p &lt; 0,001</b>	45 ± 5 %	<b>p &lt; 0,05</b>
<b>16 Hz</b>	91 ± 3 %	76 ± 4 %	<b>p &lt; 0,001</b>	72 ± 5 %	<b>p &lt; 0,05</b>

Tab.5,6: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) und L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. bzw. nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.8.2 Einfluß auf die VIP und ANP induzierte Relaxation

Die Zugabe von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) hat bei der durch VIP erzielten Relaxation keinen signifikanten Effekt. So ändert sich die verbleibende Kontraktion von

55±6% bei  $10^{-10}$  [mol/l] und 99±1% bei  $3 \times 10^{-9}$  [mol/l] auf 57±6% bzw. 97±2% (n=9), was jedoch nicht statistisch signifikant war (p= 0,817 bzw. p=0,384).

Auch bei der ANP induzierten Relaxation hatte die Zugabe von L-NNA ( $3 \times 10^{-4}$  [mol/l]) keinen signifikanten Einfluß. Zwar änderte sich die nach Zugabe von ANP in der Konzentration von  $10^{-8}$  [mol/l] bzw.  $10^{-7}$  [mol/l] verbleibende Kontraktion von 24±2% und 36±2% unter dem Einfluß von L-NNA ( $3 \times 10^{-4}$  [mol/l]) auf 20±6% bzw. 42±7% (n=7), dies war jedoch statistisch nicht signifikant (p= 0,481 bzw. p= 0,190).

VIP	Kontrolle	L-NNA	
	(n=26)	(10 <sup>-4</sup> [mol/l]) (n=9)	
Konzentration [mol/l]	% Kontraktion	% Kontraktion	
<b>10<sup>-11</sup></b>	80±2%	77±5%	p = 1,00
<b>3x10<sup>-11</sup></b>	60±3%	58±7%	p = 0,363
<b>10<sup>-10</sup></b>	46±4%	41±6%	p = 0,817
<b>3x10<sup>-10</sup></b>	29±4%	22±5%	p = 0,531
<b>10<sup>-9</sup></b>	14±3%	7±4%	p = 0,091
<b>3x10<sup>-9</sup></b>	6±3%	2±2%	p = 0,384
<b>10<sup>-8</sup></b>	1±1%	0±0%	p = 0,332

ANP	Kontrolle	L-NNA	
	(n=31)	(3x 10 <sup>-4</sup> [mol/l]) (n=9)	
Konzentration [mol/l]	% Kontraktion	% Kontraktion	
<b>10<sup>-9</sup></b>	90±1%	93±2%	p = 0,358
<b>3x10<sup>-9</sup></b>	84±1%	88±4%	p = 0,291
<b>10<sup>-8</sup></b>	77±2%	80±6%	p = 0,481
<b>3x10<sup>-8</sup></b>	72±2%	69±7%	p = 0,704
<b>10<sup>-7</sup></b>	65±2%	58±7%	p = 0,190
<b>3x10<sup>-7</sup></b>	58±2%	48±8%	p = 0,058
<b>10<sup>-6</sup></b>	53±3%	41±8%	p = 0,126

Tab.7,8: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die VIP bzw. ANP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.9 Einfluß von Apamin

Apamin ist ein aus Bienengift isoliertes Toxin, das als Inhibitor der Ca<sup>2+</sup> abhängigen Kaliumkanäle mit niedriger Leitfähigkeit wirkt. Über diese Kanäle entfalten Purine wie ATP ihre inhibitorische Wirkung.

Auf die EFS induzierte Relaxation nach 20 sec. hatte Apamin keinen signifikanten Einfluß. So reduzierte sich nach Zugabe von Apamin ( $10^{-6}$  [mol/l]) die EFS induzierte Relaxation bei 2 Hz und 8 Hz von 42±5% bzw. 54±5% auf

38±5% bzw. 49±5% (n=12), jedoch war dies statistisch nicht signifikant (p= 0,049 bzw. p= 0,052).

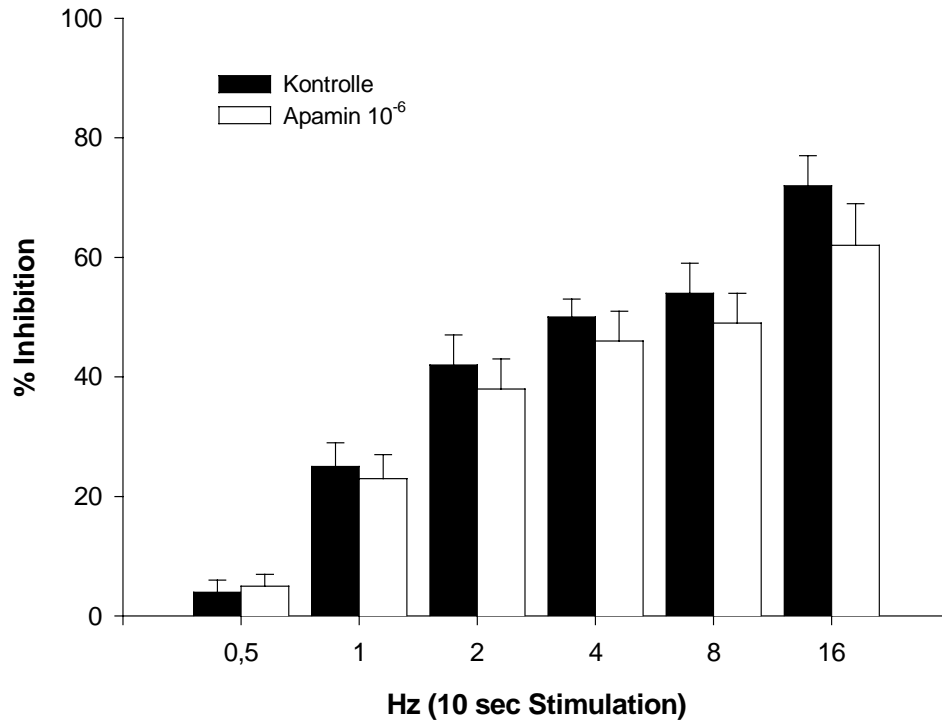


Abb.18: Einfluß von Apamin (10<sup>-6</sup> [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. (n=12) Apamin wurde 10 min. im System inkubiert.

In der Zusammenfassung sieht der Einfluß von Apamin wie folgt aus:

20 sec.	Kontrolle	Apamin (10 <sup>-6</sup> [mol/l])	
	(n=12)	(n=12)	
Stimulationsfrequenz	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	4 ± 2%	5 ± 2%	p = 0,605
<b>1 Hz</b>	25 ± 4%	23 ± 4%	p = 0,432
<b>2 Hz</b>	42 ± 5%	38 ± 5%	p = 0,482
<b>4 Hz</b>	50 ± 3%	46 ± 5%	p = 0,135
<b>8 Hz</b>	54 ± 5%	49 ± 5%	p = 0,052
<b>16 Hz</b>	72 ± 5%	62 ± 4%	p = 0,106

1 min.	Kontrolle	Apamin (10 <sup>-6</sup> [mol/l])	
	(n=12)	(n=12)	
Stimulationsfrequenz	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	3 ± 2%	5 ± 3%	p = 0,785
<b>1 Hz</b>	11 ± 3%	9 ± 4%	p = 0,294
<b>2 Hz</b>	16 ± 4%	15 ± 4%	p = 0,141
<b>4 Hz</b>	21 ± 4%	19 ± 4%	p = 0,059
<b>8 Hz</b>	41 ± 5%	33 ± 4%	p = 0,063
<b>16 Hz</b>	69 ± 5%	58 ± 5%	p = 0,333

Tab.9,10: Einfluß von Apamin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. bzw. nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

Auch auf die 1 min. nach Stimulationsende gemessene Relaxation hatte Apamin ( $10^{-6}$  [mol/l]) keinen signifikanten Einfluß. Zwar änderte sich die erzielte Inhibition bei 2 Hz von  $16\pm 13\%$  und bei 8 Hz von  $41\pm 12\%$  auf  $15\pm 14\%$  bzw.  $33\pm 13\%$  (n=13), jedoch war dieser Effekt statistisch nicht signifikant ( $p = 0,218$  bzw.  $p = 0,383$ ).

### 3.10 Einfluß des Inhibitors der löslichen Guanylatzyklase ODQ

ODQ ( $^1\text{H}$ -[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one) ist ein selektiver Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase, einem Enzym, das durch NO aktiviert wird und die Bildung des second messengers zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert. Das Enzym wird durch eine Erhöhung des intrazellulären NO-Gehalts stimuliert.

Die Zugabe von ODQ auf den unstimulierten Muskelstreifen bewirkt keine meßbare Änderung des Ruhetonus. Auf den serotoninstimulierten Magenstreifen zugegeben bewirkt ODQ jedoch eine mittlere Plateauerhöhung von 11 %.

#### 3.10.1 Einfluß auf die EFS

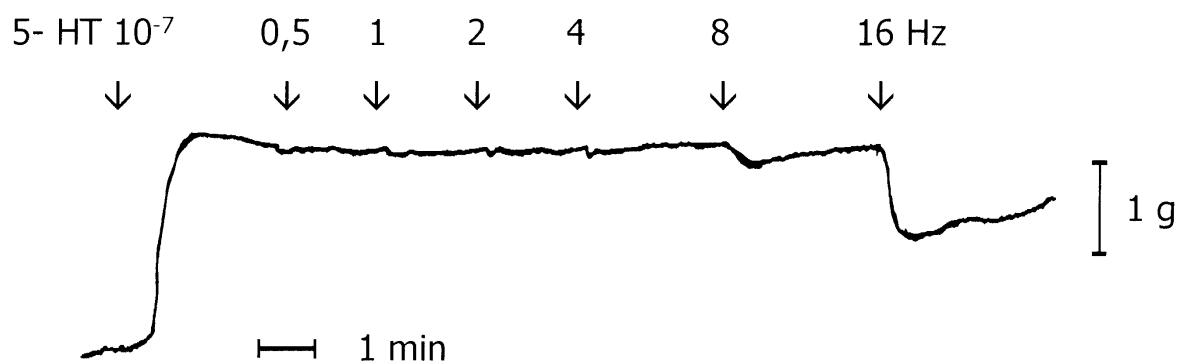


Abb.19: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) induzierte Relaxation (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) wurde 10 min. im System inkubiert.

Bei der NO vermittelten Relaxation (Auswertung 20 sec. nach Stimulationsende) bewirkt die Zugabe von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) eine signifikante Reduktion der Relaxation in allen Frequenzbereichen. So reduzierte sich unter dem Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) signifikant die 20 sec. nach Stimulationsende gemessene Relaxation bei 2 Hz von  $57\pm 4\%$  auf  $23\pm 3\%$  und bei 8 Hz von  $80\pm 4\%$  auf  $50\pm 6\%$  ( $n=10$ ) ( $p < 0,0001$  bzw.  $p = 0,005$ ).

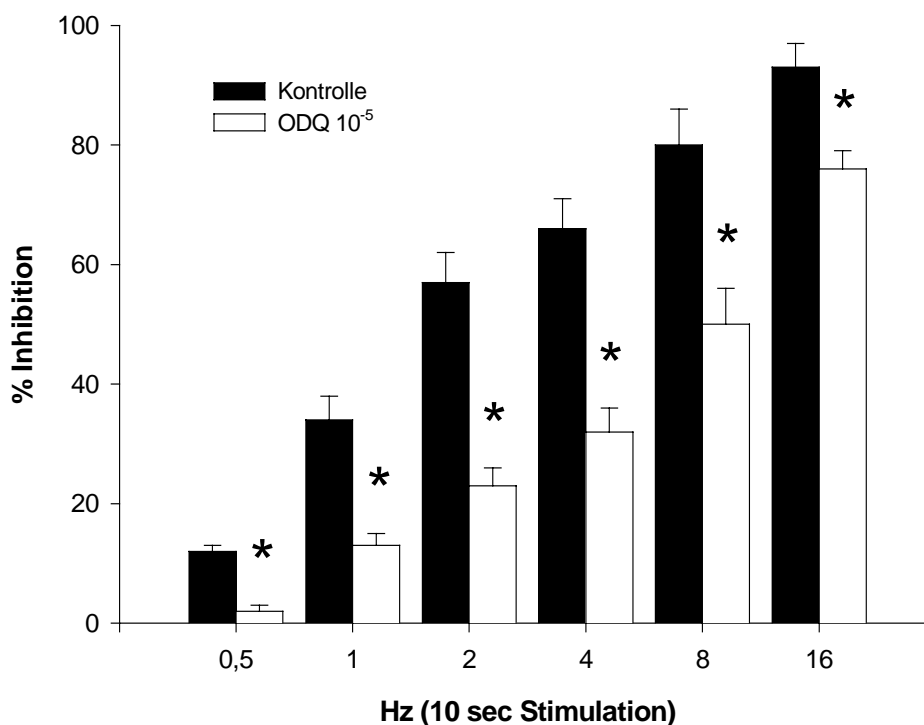


Abb.20: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. ( $n=10$ ). ODQ wurde 10 min. im System inkubiert.

Die Auswertung der EFS induzierten Relaxation 20 sec. bzw 1 min. nach Stimulationsende ergibt folgendes Bild:

20 sec.	Kontrolle	ODQ (10 <sup>-5</sup> [mol/l])	
	(n=30)	(n=10)	
Stimulations- frequenz	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	8 ± 4 %	2 ± 1 %	<b>p = 0,008</b>
<b>1 Hz</b>	33 ± 4 %	13 ± 2 %	<b>p = 0,002</b>
<b>2 Hz</b>	59 ± 5 %	23 ± 3 %	<b>p &lt; 0,001</b>
<b>4 Hz</b>	69 ± 6 %	32 ± 4 %	<b>p &lt; 0,001</b>
<b>8 Hz</b>	82 ± 5 %	50 ± 6 %	<b>p = 0,005</b>
<b>16 Hz</b>	95 ± 3 %	76 ± 3 %	<b>p = 0,008</b>

1 min.	Kontrolle	ODQ (10 <sup>-5</sup> [mol/l])	
	(n=30)	(n=10)	
Stimulations- frequenz	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	6 ± 3 %	7 ± 1 %	p = 0.273
<b>1 Hz</b>	15 ± 3 %	14 ± 3 %	p = 0.315
<b>2 Hz</b>	25 ± 4 %	21 ± 4 %	p = 0.082
<b>4 Hz</b>	36 ± 5 %	25 ± 4 %	p = 0.195
<b>8 Hz</b>	61 ± 5 %	43 ± 5 %	p = 0.218
<b>16 Hz</b>	91 ± 3 %	74 ± 5 %	<b>p = 0.06</b>

Tab.11,12: Einfluß von ODQ (10<sup>-5</sup> [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. bzw. nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

Auf die Auswertung 1 min. nach Stimulationsende zeigt sich durch die Zugabe von ODQ keine signifikante Reduktion der Relaxation bei 8 Hz von 57±6% auf 43±5% (n=10) (p= 0,138). Bei Stimulation mit 16 Hz reduziert sich die Relaxation signifikant von 92±4% auf 74±5% (p= 0,006), jedoch liegt, wie bereits beschrieben, zwischen den Kontrollstimulationen ein signifikanter Unterschied vor. Im Bereich der EFS mit VIP Freisetzung hat ODQ (10<sup>-5</sup> [mol/l]) also nur einen geringen oder schwer zu beurteilenden Effekt.

### 3.10.2 Einfluß auf die DEA NO induzierte Relaxation

Auch auf die durch DEA NO induzierte Relaxation hatte ODQ eine konzentrationsabhängige Reduktion der Relaxation zur Folge.

So erhöhte sich nach Zugabe von ODQ (10<sup>-5</sup> [mol/l]) die mit DEA NO 3x10<sup>-6</sup> [mol/l]) und 3x10<sup>-5</sup> [mol/l]) verbleibende Kontraktion von 53±7% bzw. 7±3% auf 99±5% bzw. 76±10% (n=6). Dies war statistisch signifikant (p jeweils < 0,001).

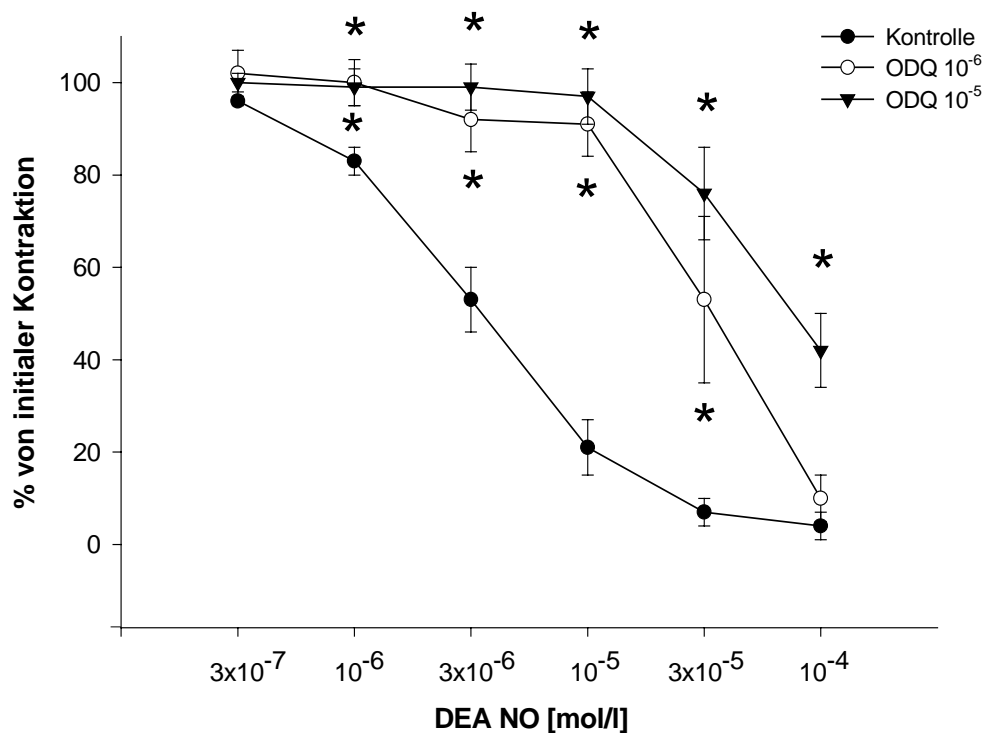


Abb.21: Einfluß von ODQ auf die DEA NO induzierte Relaxation. DEA NO wurde kumulativ zugegeben. Die Relaxation wurde 2 min. nach DEA NO Zugabe bestimmt. ODQ wurde 10 min. im System inkubiert.

In der Übersicht zeigt sich der Einfluß von ODQ auf die DEA NO induzierte Relaxation:

DEA NO Konzentration [mol/l]	Kontrolle (n=28)	ODQ (10 <sup>-5</sup> [mol/l]) (n=8)	
	% Kontraktion	% Kontraktion	
3x10 <sup>-7</sup>	98 ± 2 %	100 ± 2 %	p = 0,273
10 <sup>-6</sup>	87 ± 3 %	99 ± 4 %	p = 0,03
3x10 <sup>-6</sup>	73 ± 6 %	99 ± 5 %	p < 0,001
10 <sup>-5</sup>	36 ± 6 %	97 ± 6 %	p < 0,001
3x10 <sup>-5</sup>	21 ± 6 %	76 ± 10 %	p < 0,001
10 <sup>-4</sup>	5 ± 3 %	42 ± 8 %	p < 0,001

Tab.13: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation bestimmt 2 min. nach Substanzzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.10.3 Einfluß auf die VIP und ANP induzierte Relaxation

Die Zugabe von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) hatte keinen signifikanten Effekt auf die durch VIP induzierte Relaxation. So ändert sich die nach Zugabe von VIP verbleibende Kontraktion bei einer Konzentration von  $10^{-10}$  [mol/l] von  $61 \pm 10\%$  auf  $61 \pm 14\%$  und bei  $3 \times 10^{-9}$  [mol/l] von  $88 \pm 8$  auf  $87 \pm 10\%$  ( $n=9$ ), jedoch war dies statistisch nicht signifikant ( $p=1$  bzw.  $p=0,769$ ).

Eine Übersicht über den Einfluß von N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA)( $10^{-4}$  [mol/l]) und ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation ergibt folgendes Diagramm:

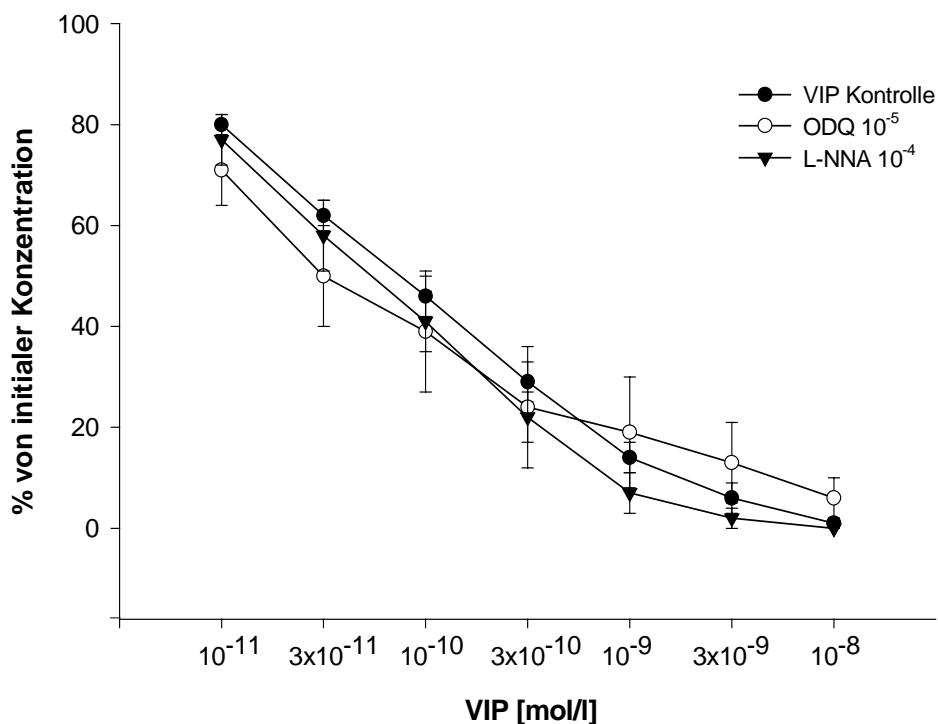


Abb.22: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) und N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA)( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Zwischen den Relaxationswerten besteht kein signifikanter Unterschied.



Auch auf die ANP induzierte Relaxation hat ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) keinen signifikanten Effekt. So ändert sich die verbleibende Kontraktion bei einer ANP Konzentration von  $10^{-8}$  [mol/l] von  $24 \pm 2\%$  auf  $22 \pm 5\%$ , und bei  $10^{-7}$  [mol/l] von  $35 \pm 2$  auf  $30 \pm 3\%$  ( $p = 0,664$  bzw.  $0,228$ )( $n=7$ ).

Die folgende Übersicht verdeutlicht den Einfluß von N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA)( $10^{-4}$  [mol/l]) und ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die ANP induzierte Relaxation:

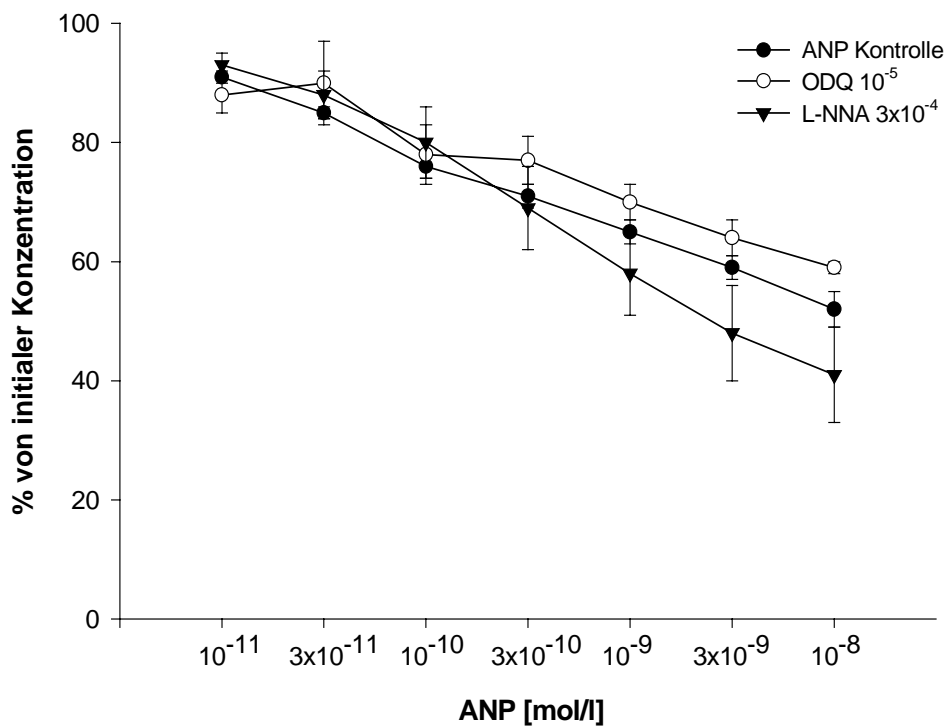


Abb.23: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) und N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA)( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Zwischen den Relaxationswerten besteht kein signifikanter Unterschied.

Auf die VIP bzw. ANP induzierte Relaxation wirkt sich die Zugabe von ODQ folgendermaßen aus:

VIP	Kontrolle	ODQ ( $10^{-5}$ [mol/l])	
	(n=26)	(n=9)	
Konzentration [mol/l]	% Kontraktion	% Kontraktion	
$10^{-11}$	80±2%	71±7%	p = 0,615
$3 \times 10^{-11}$	60±3%	50±10%	p = 0,622
$10^{-10}$	46±4%	39±12%	p = 1,00
$3 \times 10^{-10}$	29±4%	24±12%	p = 0,916
$10^{-9}$	14±3%	19±11%	p = 0,796
$3 \times 10^{-9}$	6±3%	13±8%	p = 0,940
$10^{-8}$	1±1%	6±4%	p = 0,626

ANP	Kontrolle	ODQ ( $10^{-5}$ [mol/l])	
	(n=31)	(n=9)	
Konzentration [mol/l]	% Kontraktion	% Kontraktion	
$10^{-9}$	90±1%	88±3%	p = 0,227
$3 \times 10^{-9}$	84±1%	85±3%	p = 0,230
$10^{-8}$	77±2%	78±5%	p = 0,664
$3 \times 10^{-8}$	72±2%	77±4%	p = 0,172
$10^{-7}$	65±2%	70±3%	p = 0,228
$3 \times 10^{-7}$	58±2%	64±3%	p = 0,228
$10^{-6}$	53±3%	59±1%	p = 0,225

Tab.14,15: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die VIP bzw. ANP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.11 Einfluß des Inhibitors der Proteinkinase A KT 5720

KT 5720 ist ein selektiver Inhibitor der Proteinkinase A, die durch eine Erhöhung des cAMP Spiegels aktiviert wird und eine glattmuskuläre Relaxation vermittelt.

Die Zugabe von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) hatte keinen meßbaren Effekt auf den Tonus des unstimulierten oder mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) vorstimulierten Muskelstreifens.

### 3.11.1 Einfluß auf die EFS

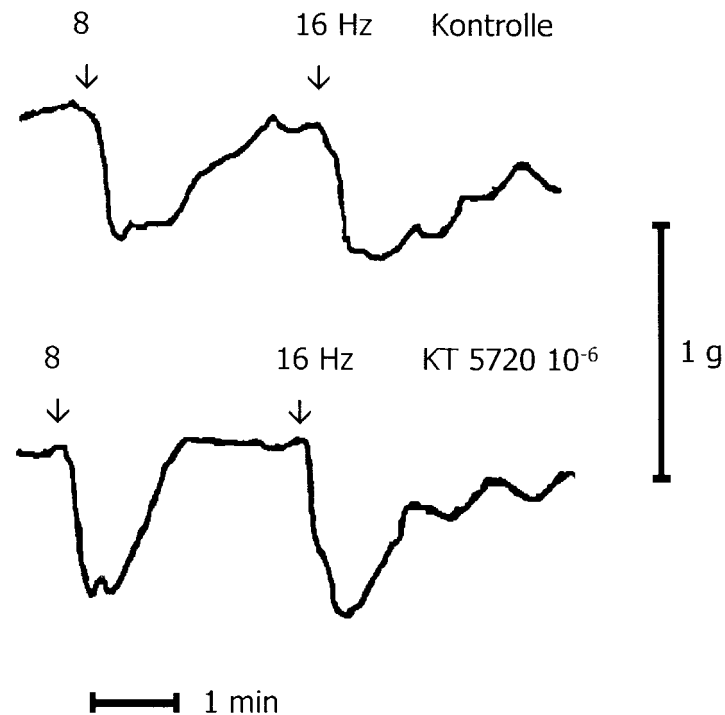


Abb.24: Einfluß von KT 5720 auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation ) induzierte Relaxation bei 8 und 16 Hz (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).

KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) hatte vor allem im höherfrequenten Stimulationsbereich eine Reduktion der verzögert einsetzenden Relaxation zur Folge.

So reduzierte KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) die 1 min. nach Stimulationsende bestimmte Relaxation bei 8 Hz von  $61 \pm 6\%$  auf  $34 \pm 4\%$  und von  $91 \pm 4\%$  auf  $51 \pm 4\%$  bei 16 Hz ( $n=12$ ). Dies war jeweils statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,001$ ).

Die bei 2 Hz erzielte, 20 sec. nach Stimulationsende gemessene Relaxation wurde durch KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) bei 2 Hz von  $53 \pm 5\%$  auf  $42 \pm 4\%$  ( $n=12$ ) reduziert, jedoch war diese Reduktion statistisch nicht signifikant ( $p = 0,260$ ).

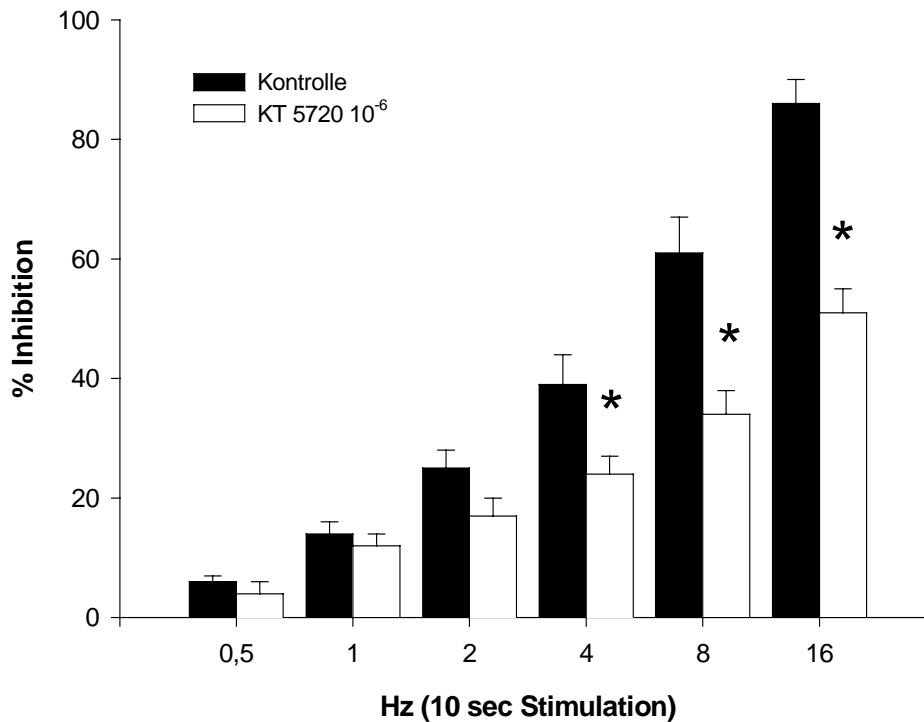


Abb.25: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation 1 min. nach Stimulationsende. KT 5720 wurde 15 min. im System inkubiert.

Der Einfluß von KT 5720 auf die EFS induzierte Relaxation bestimmt 20 sec. bzw. 1 min. nach Stimulationsende stellt sich wie folgt dar:

20 sec.	Kontrolle	KT 5720	
	(n=30)	(10 <sup>-6</sup> [mol/l]) (n=10)	
Stimulations- frequenz	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	8 ± 4 %	5 ± 1 %	p = 0.349
<b>1 Hz</b>	33 ± 4 %	25 ± 3 %	p = 0.068
<b>2 Hz</b>	59 ± 5 %	42 ± 4 %	p = 0.260
<b>4 Hz</b>	69 ± 6 %	49 ± 5 %	<b>p = 0.012</b>
<b>8 Hz</b>	82 ± 5 %	52 ± 3 %	<b>p &lt; 0,001</b>
<b>16 Hz</b>	95 ± 3 %	63 ± 4 %	<b>p &lt; 0,001</b>

1 min.	Kontrolle	KT 5720	
	(n=30)	(10 <sup>-6</sup> [mol/l]) (n=10)	
Stimulations- frequenz	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	6 ± 3 %	4 ± 2 %	p = 0.049
<b>1 Hz</b>	15 ± 3 %	12 ± 2 %	p = 0.174
<b>2 Hz</b>	25 ± 4 %	17 ± 3 %	p = 0.283
<b>4 Hz</b>	36 ± 5 %	24 ± 3 %	<b>p = 0.005</b>
<b>8 Hz</b>	61 ± 5 %	34 ± 4 %	<b>p &lt; 0.001</b>
<b>16 Hz</b>	91 ± 3 %	51 ± 4 %	<b>p &lt; 0.001</b>

Tab.16,17: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. bzw. nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.11.2 Einfluß auf die VIP und ANP induzierte Relaxation

Die VIP induzierte Relaxation wird durch KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) signifikant reduziert. Bei einer VIP Konzentration von  $10^{-9}$  erhöht sich die verbleibende Kontraktion von  $15\pm 4\%$  auf  $35\pm 3\%$  und bei  $3\times 10^{-9}$  von  $4\pm 2\%$  auf  $18\pm 4\%$  ( $n=9$ ) ( $p = 0,015$  bzw.  $0,016$ ).

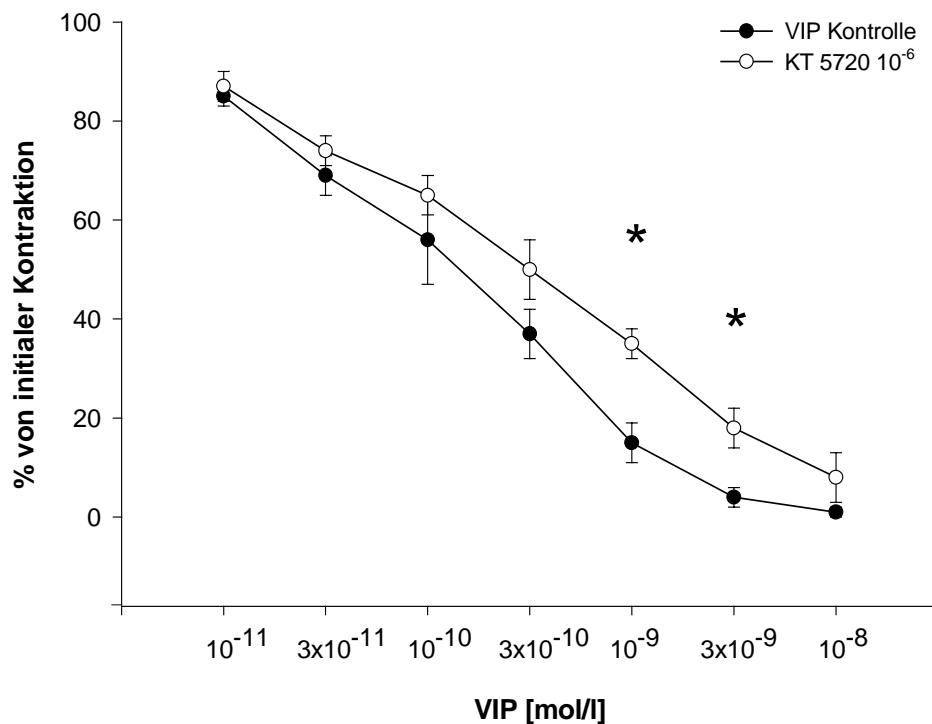


Abb.26: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation ( $n=9$ ). KT 5720 wurde 15 min. im System inkubiert.

Auch die durch ANP induzierte Relaxation wird durch KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) signifikant reduziert. So erhöht sich die verbleibende Kontraktion nach Zugabe von ANP  $10^{-8}$  von  $73\pm 6\%$  auf  $89\pm 3\%$  und bei  $10^{-6}$  von  $47\pm 6\%$  auf  $65\pm 3\%$  ( $p = 0,024$  bzw.  $0,011$ )( $n=9$ ).

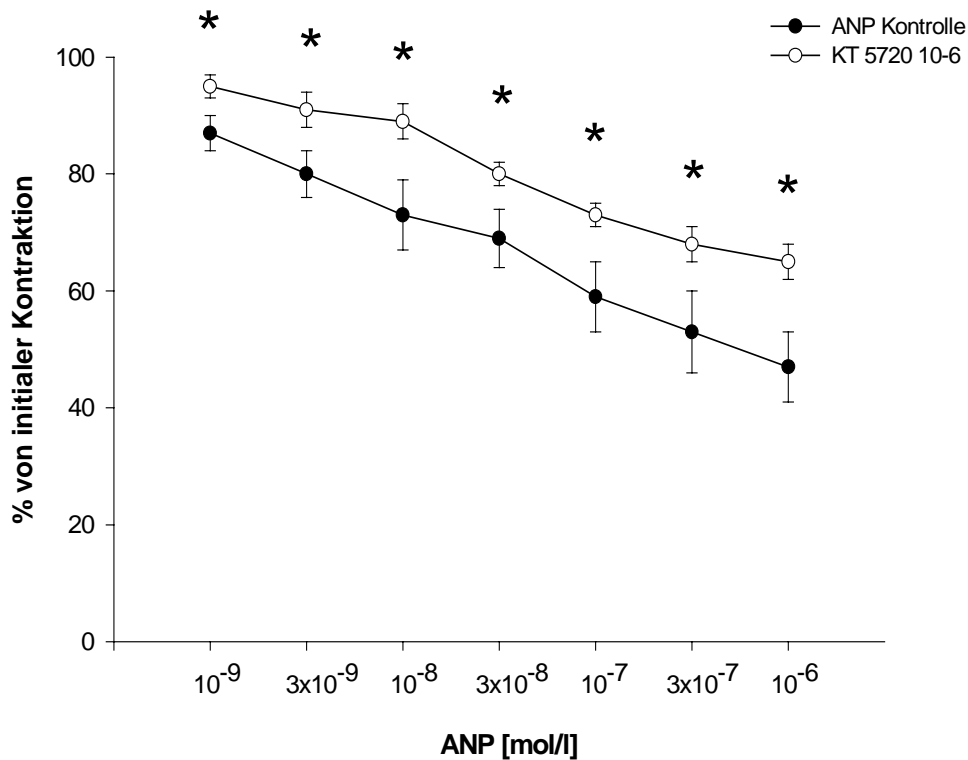


Abb.27: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die ANP induzierte Relaxation (n=9). KT 5720 wurde 15 min. im System inkubiert.

Einen Überblick über den Einfluß KT 5720 auf die VIP bzw. ANP induzierte Relaxation ist in den folgenden Tabellen zusammenfaßt:

VIP Konzentration [mol/l]	Kontrolle (n=26)	KT 5720 ( $10^{-6}$ [mol/l]) (n=9)	
	% Kontraktion	% Kontraktion	p
$10^{-11}$	80±2%	86±3%	p = 0,048
$3 \times 10^{-11}$	60±3%	74±3%	p = 0,067
$10^{-10}$	46±4%	63±4%	p = 0,116
$3 \times 10^{-10}$	29±4%	47±5%	p = 0,202
$10^{-9}$	14±3%	30±4%	<b>p = 0,015</b>
$3 \times 10^{-9}$	6±3%	15±4%	<b>p = 0,016</b>
$10^{-8}$	1±1%	7±4%	p = 0,207

ANP Konzentration [mol/l]	Kontrolle (n=31)	KT 5720 ( $10^{-6}$ [mol/l]) (n=9)	
	% Kontraktion	% Kontraktion	p
$10^{-9}$	90±1%	95±2%	<b>p = 0,044</b>
$3 \times 10^{-9}$	84±1%	91±3%	<b>p = 0,035</b>
$10^{-8}$	77±2%	98±3%	<b>p = 0,024</b>
$3 \times 10^{-8}$	72±2%	80±2%	<b>p = 0,041</b>
$10^{-7}$	65±2%	73±2%	<b>p = 0,033</b>
$3 \times 10^{-7}$	58±2%	68±3%	<b>p = 0,045</b>
$10^{-6}$	53±3%	65±3%	<b>p = 0,011</b>

Tab.18,19: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die VIP bzw. ANP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.12 Einfluss des Inhibitors der Phosphodiesterase V Zaprinast

Zaprinast wirkt als Inhibitor der cGMP spezifischen Phosphodiesterase (PDE) V. Diese PDE ist fuer die Spaltung des second messengers cGMP zustaendig und limitiert somit die cGMP vermittelte Relaxation.

Die Zugabe von Zaprinast hatte weder auf das Ruheplateau noch auf den mit Serotonin vorstimulierten Muskelstreifen einen meßbaren Einfluß.

#### 3.12.1 Einfluß auf die EFS

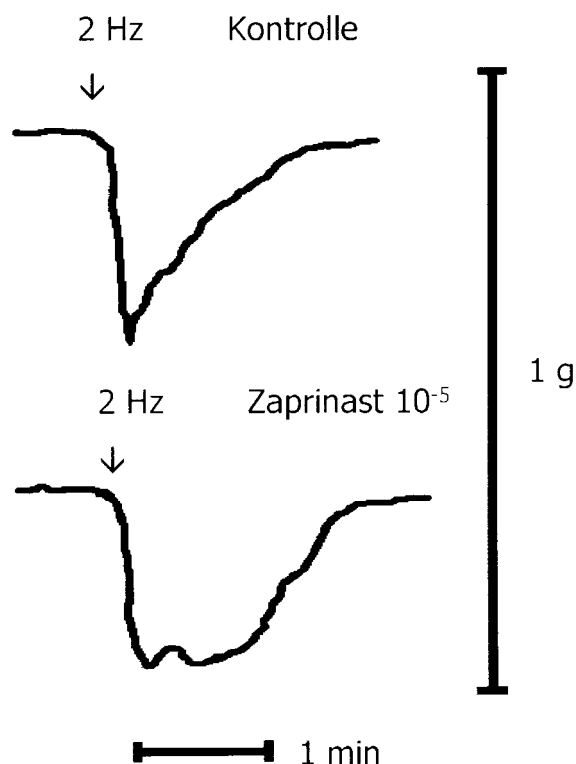


Abb.28: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation bei 2 Hz (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Zaprinast wurde 15 min. im System inkubiert.

So zeigte sich kein verstärkender Effekt auf die 20 sec. nach Stimulationsende bestimmte Relaxation. Bei Stimulation mit 2 Hz änderte sich nach Zugabe von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) die erzielte Inhibition gegenüber der Kontrolle von  $64\pm 4\%$  auf  $66\pm 3\%$  ( $n=8$ ). Dies war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,096$ ).

Bei der Auswertung nach 1 min. zeigt sich nach Stimulation in Frequenzbereichen, in denen von einer überwiegenden NO Freisetzung auszugehen ist, eine signifikante Verlängerung der erzielten Relaxation. So ist nach Stimulation mit 1 Hz und 2 Hz unter Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) die erzielte Relaxation 1 min. nach Stimulationsende bei  $30\pm 4\%$  bzw.  $45\pm 5\%$  gegenüber  $21\pm 3\%$  bzw.  $32\pm 3\%$  ( $n=8$ ) bei der Kontrolle. Diese Verstärkung der Relaxation war statistisch signifikant ( $p = 0,042$  bzw.  $p = 0,007$ ).

In den höherfrequenten Stimulationsbereichen (8 und 16 Hz) jedoch, in denen die verzögert einsetzende Relaxation von Bedeutung ist, zeigt sich 1 min. nach Stimulation kein signifikanter Effekt. So änderte sich nach Zugabe von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) die bei 8 und 16 Hz induzierte Relaxation von  $84\pm 3\%$  bzw.  $92\pm 5\%$  auf  $80\pm 6\%$  bzw.  $100\pm 0\%$  ( $n=8$ ) bei der Kontrollstimulation. Dies war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,577$  bzw.  $p = 0,250$ ).

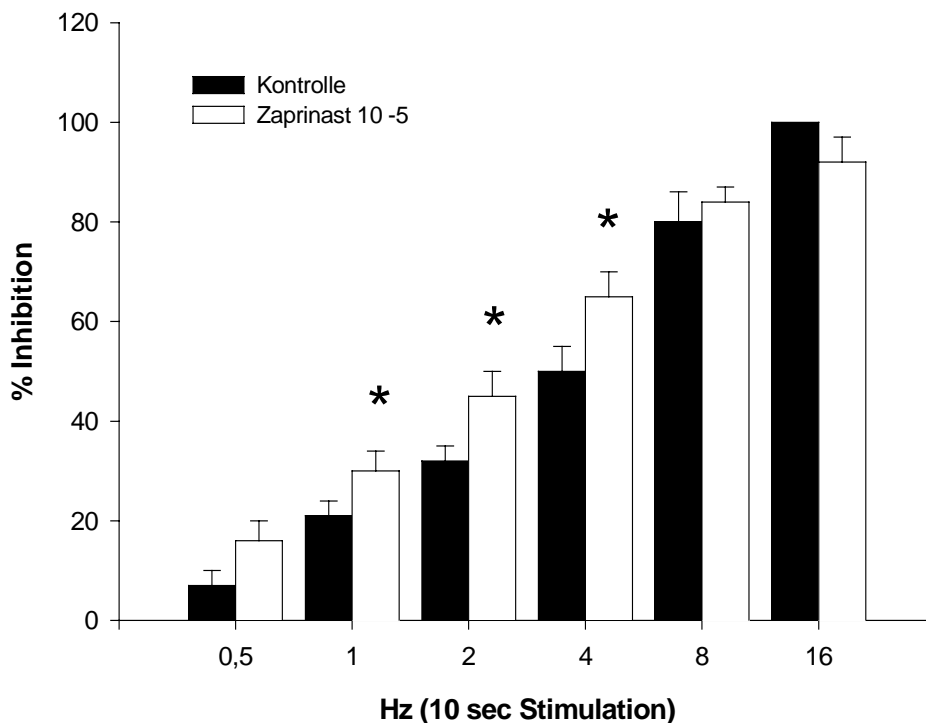




Abb.29: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation (Auswertung nach 1 min.). Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) wurde 15 min. im System inkubiert.

In der 1 min. nach Stimulationsende bestimmten EFS induzierten Relaxation zeigt sich der folgende Einfluß von Zaprinast:

1 min. Stimulations- frequenz	Kontrolle (n=17)	Zaprinast ( $10^{-5}$ [mol/l]) (n=8)	
	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	8 ± 5 %	16 ± 4 %	p = 0,111
<b>1 Hz</b>	20 ± 6 %	30 ± 4 %	<b>p = 0,042</b>
<b>2 Hz</b>	33 ± 7 %	45 ± 5 %	<b>p = 0,007</b>
<b>4 Hz</b>	53 ± 7 %	65 ± 5 %	<b>p = 0,020</b>
<b>8 Hz</b>	79 ± 5 %	84 ± 3 %	p = 0,577
<b>16 Hz</b>	98 ± 5 %	92 ± 5 %	p = 0,250

Tab.20: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation in der Auswertung nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.12.2 Einfluß auf die VIP induzierte Relaxation

Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) hatte keinen signifikanten Effekt auf die VIP induzierte Relaxation. So verringert sich unter Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) die nach Zugabe von VIP in der Konzentration  $10^{-10}$  [mol/l] und  $3 \times 10^{-9}$  [mol/l] verbleibende Kontraktion auf  $30 \pm 8\%$  bzw.  $0 \pm 0\%$  gegenüber  $33 \pm 7\%$  bzw.  $3 \pm 2\%$  (n=9) bei der Kontrolle, jedoch war diese Veränderung statistisch nicht signifikant (p = 0,706 bzw. p= 0,153).

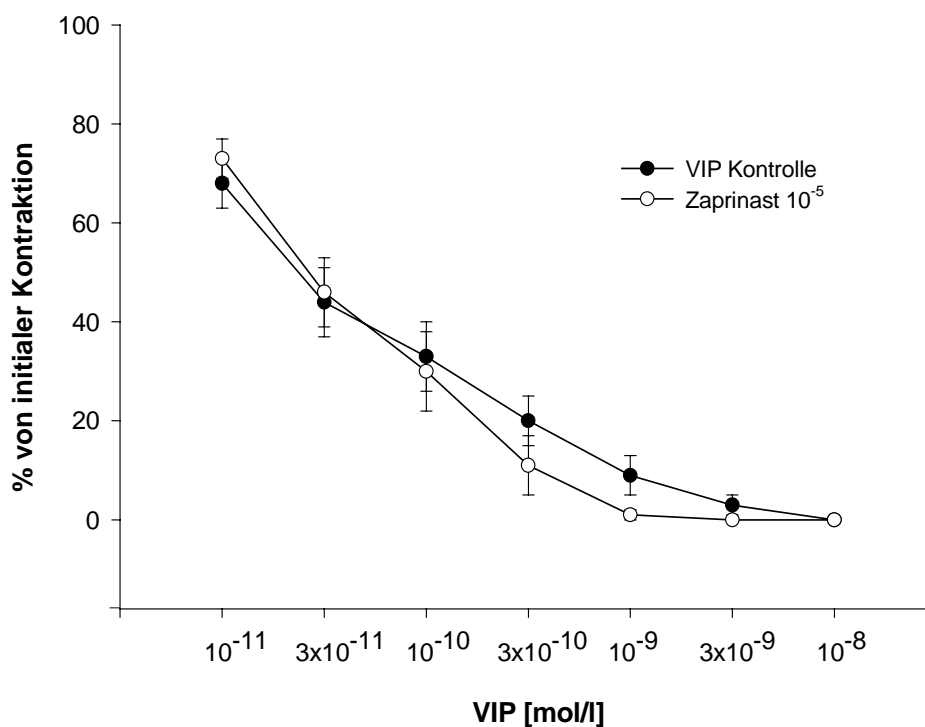


Abb.30: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) wurde 15 min. im System inkubiert.

Der Einfluß von Zaprinast auf die VIP induzierte Relaxation stellt sich in der Übersicht wie folgt dar:

VIP Konzentration [mol/l]	Kontrolle (n=9)	Zaprinast ( $10^{-5}$ [mol/l]) (n=9)	
	% Kontraktion	% Kontraktion	p
<b>10<sup>-11</sup></b>	68 ± 5 %	73 ± 4 %	p = 0,446
<b>3x10<sup>-11</sup></b>	44 ± 7 %	46 ± 7 %	p = 0,842
<b>10<sup>-10</sup></b>	33 ± 7 %	30 ± 8 %	p = 0,706
<b>3x10<sup>-10</sup></b>	20 ± 5 %	11 ± 6 %	p = 0,266
<b>10<sup>-9</sup></b>	9 ± 4 %	1 ± 1 %	p = 0,070
<b>3x10<sup>-9</sup></b>	3 ± 2 %	0 ± 0 %	p = 0,153
<b>10<sup>-8</sup></b>	0 ± 0 %	0 ± 0 %	p = 1,000

Tab.21: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.12.3 Einfluss auf die DEA-NO induzierte Relaxation

Auf den exogen zugegebenen NO Donor DEA-NO bewirkte Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) zwar eine Verstärkung der Relaxation in allen Konzentrationsbereichen, doch war dieser Effekt statistisch nicht signifikant. Unter Einfluss von Zaprinast reduzierte sich die nach Zugabe einer DEA NO Konzentration von  $10^{-6}$  [mol/l] verbleibende Kontraktion von  $90\pm 4\%$  auf  $80\pm 9\%$  und bei  $10^{-5}$  [mol/l] von  $60\pm 6\%$  auf  $52\pm 11\%$ . Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,438$  bzw.  $p=0,654$ ).

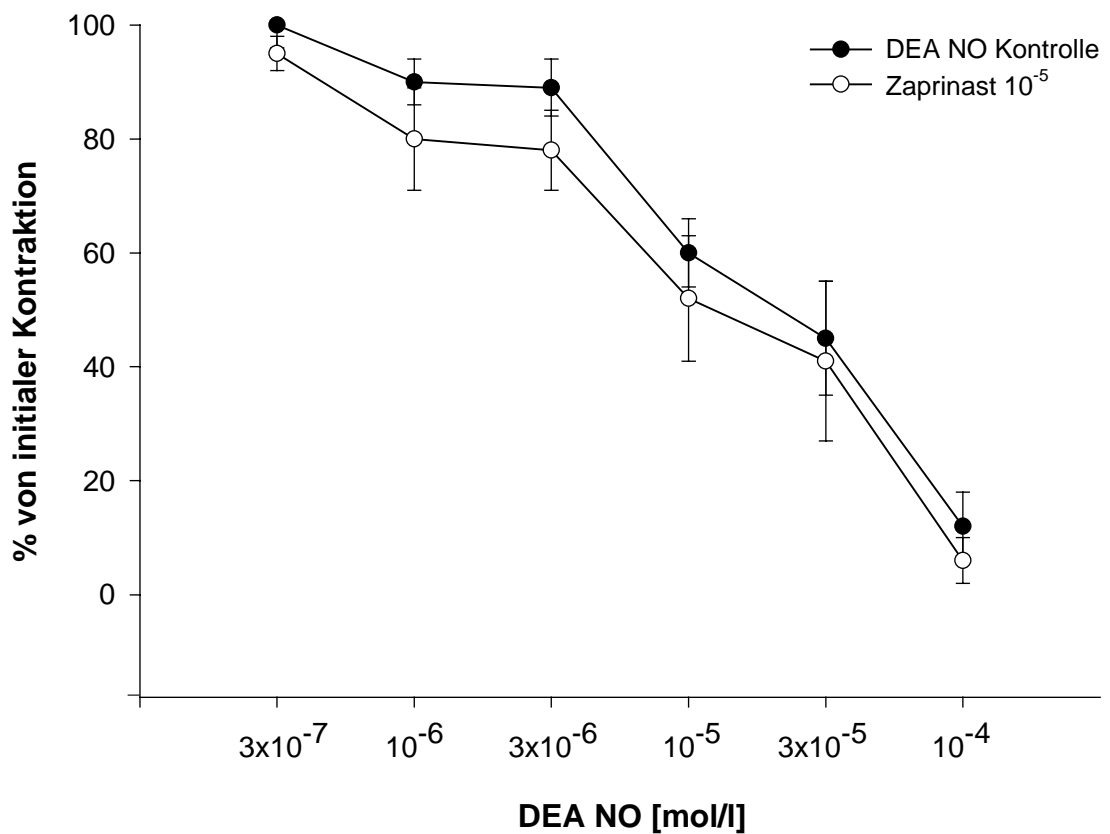


Abb.31: Einfluss von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation. Der Effekt ist statistisch nicht signifikant.

In der Übersicht stellt sich der Effekt von Zaprinast folgendermaßen dar:

DEA NO	Kontrolle	Zaprinast	
	(n=28)	(10 <sup>-5</sup> [mol/l]) (n=11)	
Konzentration [mol/l]	% Kontraktion	% Kontraktion	
<b>3x10<sup>-7</sup></b>	98 ± 2 %	95 ± 3%	p = 0,317
<b>10<sup>-6</sup></b>	87 ± 3 %	80 ± 9 %	p = 0,438
<b>3x10<sup>-6</sup></b>	73 ± 6 %	78 ± 7 %	p = 0,225
<b>10<sup>-5</sup></b>	36 ± 6 %	52 ± 11%	p = 0,654
<b>3x10<sup>-5</sup></b>	21 ± 6 %	41 ± 14 %	p = 0,854
<b>10<sup>-4</sup></b>	5 ± 3 %	6 ± 4 %	p = 0,468

Tab.22: Einfluß von Zaprinast (10<sup>-5</sup> [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation bestimmt 2 min. nach Substanzzugabe. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.13 Einfluß des Inhibitors der Phosphodiesterase III Trequinsin

Trequinsin ist ein äußerst potenter Inhibitor der cGMP inhibierten cAMP spezifischen Phosphodiesterase III, einem Enzym, das intrazelluläres cAMP abbaut und durch eine Erhöhung des intrazellulären cGMP Spiegels inhibiert wird.

Eine Erhöhung des cGMP Spiegels bewirkt also unter dem Einfluß der Phosphodiesterase III einen langsameren Abbau des "second messengers" cAMP und eine cAMP vermittelte Relaxation wird langsamer beendet.

Die Zugabe von Trequinsin hatte weder einen meßbaren Effekt auf den unstimulierten noch auf den mit Serotonin vorstimulierten Muskelstreifen.

#### 3.13.1 Einfluß auf die EFS

Die Zugabe von Trequinsin (10<sup>-7</sup> [mol/l]) hatte keinen Einfluß auf die EFS induzierte Relaxation in der Auswertung nach 20 sec. So änderte sich die nach Stimulation mit 2 und 8 Hz erzielte Relaxation von 49±6% bzw. 76±6% auf 52±7% bzw. 80±9% (n=9), dies war jedoch statistisch nicht signifikant

( $p = 0,480$  bzw.  $p = 580$ ).

In der Auswertung nach 1 min. jedoch kam es zu einer statistisch signifikanten Verstärkung der EFS induzierten Relaxation. Bei Stimulation mit 1 und 8 Hz verstärkte sich signifikant die Inhibition von  $19\pm 4\%$  bzw.  $78\pm 6\%$  auf  $37\pm 8\%$  bzw.  $87\pm 6\%$  ( $p = 0,009$  bzw.  $p = 0,044$ )( $n=9$ ).

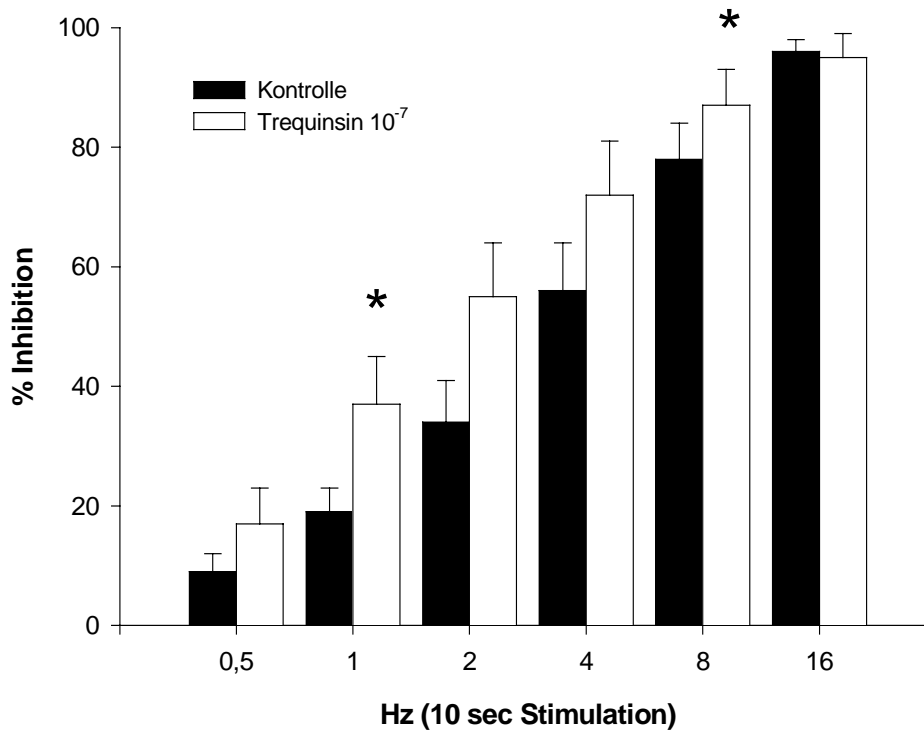


Abb.32: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation in der Auswertung nach 1 min. Trequinsin wurde 15 min. im System inkubiert ( $n=9$ ).

In der Übersicht stellt sich der Einfluß von Trequinsin auf die EFS induzierte Relaxation wie folgt dar:

1 min.	Kontrolle (n=17)	Trequinsin (10 <sup>-7</sup> [mol/l]) (n=9)	
Stimulations- frequenz	% Inhibition	% Inhibition	
<b>0,5 Hz</b>	8 ± 5 %	17 ± 6 %	p = 0,066
<b>1 Hz</b>	20 ± 6 %	37 ± 8 %	<b>p = 0,009</b>
<b>2 Hz</b>	33 ± 7 %	55 ± 9 %	p = 0,058
<b>4 Hz</b>	53 ± 7 %	72 ± 9 %	p = 0,051
<b>8 Hz</b>	79 ± 5 %	87 ± 6 %	<b>p = 0,044</b>
<b>16 Hz</b>	98 ± 5 %	95 ± 4 %	p = 0,813

Tab.23: Einfluß von Trequinsin (10<sup>-7</sup> [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation bestimmt 1 min. nach Stimulationsende. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.13.2 Einfluß auf die VIP induzierte Relaxation

Auch auf die VIP induzierte Relaxation hat Trequinsin (10<sup>-7</sup> [mol/l]) einen signifikanten Effekt. So verringert sich die nach Zugabe von VIP 3x10<sup>-11</sup> [mol/l] und 10<sup>-9</sup> [mol/l] verbleibende Kontraktion von 67±5% bzw. 17±5% auf 50±6% bzw. 11±3% (n=10). Dies war statistisch signifikant (p = 0,043 bzw. p= 0,047).

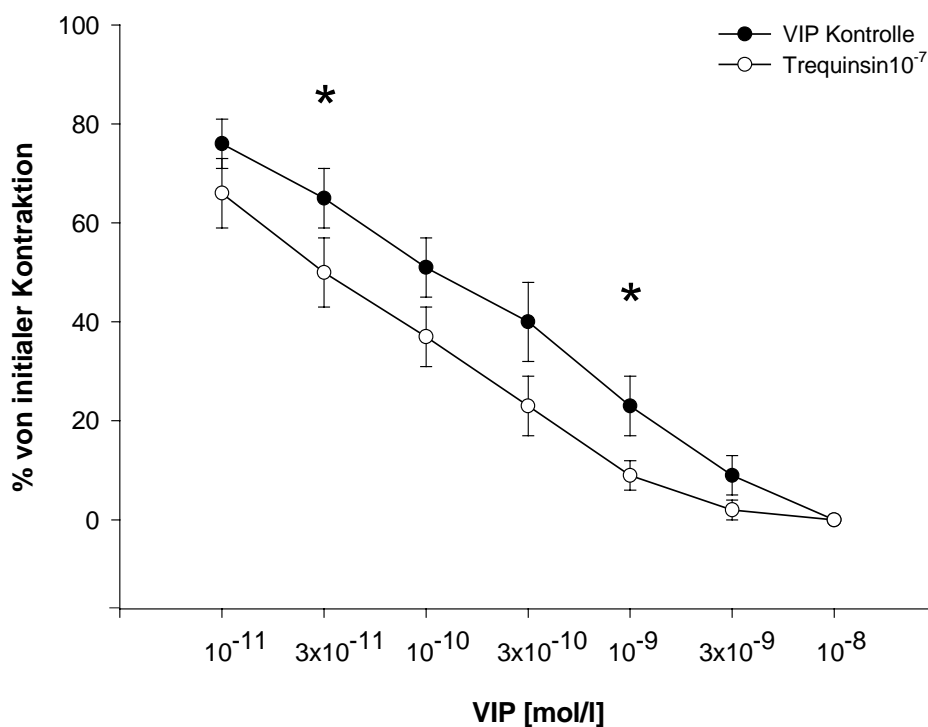


Abb.33: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Trequinsin wurde 15 min. im System inkubiert.

Der Einfluß von Trequinsin auf die VIP induzierte Relaxation ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

VIP Konzentration [mol/l]	Kontrolle (n=10)	Trequinsin ( $10^{-7}$ [mol/l]) (n=10)	p
	% Kontraktion	% Kontraktion	
$10^{-11}$	80 ± 4 %	64 ± 5 %	p = 0,253
$3 \times 10^{-11}$	68 ± 5 %	50 ± 6 %	<b>p = 0,043</b>
$10^{-10}$	54 ± 6 %	39 ± 6 %	p = 0,115
$3 \times 10^{-10}$	44 ± 7 %	25 ± 6 %	p = 0,111
$10^{-9}$	27 ± 5 %	11 ± 3 %	<b>p = 0,047</b>
$3 \times 10^{-9}$	11 ± 4 %	1 ± 1 %	p = 0,146
$10^{-8}$	1 ± 1 %	1 ± 1 %	p = 1,000

Tab.24: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

### 3.13.3 Einfluß auf die DEA NO induzierte Relaxation

Unter dem Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) änderte sich die verbleibende Kontraktion nach Zugabe des NO Donors DEA NO von  $3 \times 10^{-6}$  [mol/l] und  $3 \times 10^{-5}$  [mol/l] von  $76 \pm 5\%$  bzw.  $12 \pm 5\%$  auf  $86 \pm 4\%$  bzw.  $17 \pm 7\%$  (n=12). Dies war statistisch nicht signifikant (p = 0,083 bzw. 0,272).

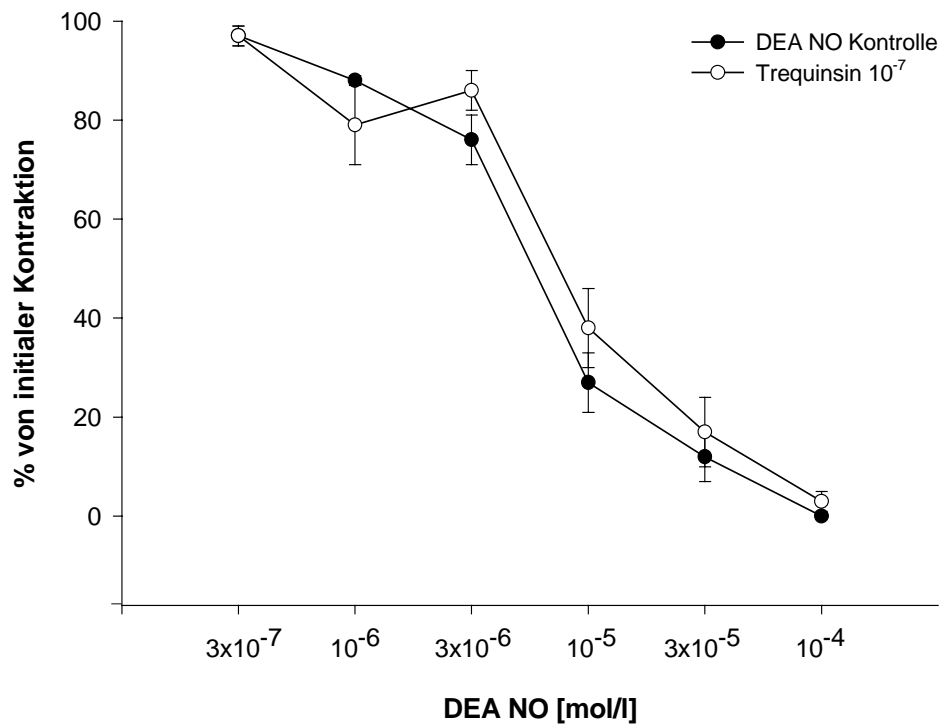


Abb.34: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Trequinsin wurde 15 min. im System inkubiert.



Der Einfluß von Trequinsin auf die DEA NO induzierte Relaxation sieht in der Übersicht wie folgt aus:

DEA NO Konzentration [mol/l]	Kontrolle (n=28)	Trequinsin (10 <sup>-7</sup> [mol/l]) (n=15)	
	% Kontraktion	% Kontraktion	
<b>3x10<sup>-7</sup></b>	98 ± 2 %	97 ± 2 %	p = 1,000
<b>10<sup>-6</sup></b>	87 ± 3 %	79 ± 8 %	p = 0,223
<b>3x10<sup>-6</sup></b>	73 ± 6 %	86 ± 4 %	p = 0,083
<b>10<sup>-5</sup></b>	36 ± 6 %	38 ± 8 %	p = 0,272
<b>3x10<sup>-5</sup></b>	21 ± 6 %	17 ± 7 %	p = 0,556
<b>10<sup>-4</sup></b>	5 ± 3 %	3 ± 2 %	p = 0,104

Tab.25: Einfluß von Trequinsin (10<sup>-7</sup> [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation bestimmt 2 min. nach Substanzzugabe. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

Die durchgeführten Versuche und deren Auswertung geben einen interessanten Einblick in die Mechanismen der NANC vermittelten Neurotransmission am Magenfundus der Ratte. In der anschließenden Diskussion sollen die Ergebnisse, deren Bedeutung sowie der Vergleich mit von anderen Arbeitsgruppen beobachteten Untersuchungen diskutiert werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Allgemeine Diskussion

Funktionell kann man den Magen in zwei Teile unterscheiden. Zum einen den proximalen Teil, der aus der Fundusregion und dem oralen Anteil des Corpus besteht. Die Fundusregion ist als Reservoir zu verstehen, das eine Aufnahme auch großer Nahrungsmengen ohne massive intraluminale Druckerhöhung ermöglicht. Zum anderen der distale Teil, der aus Corpus und Antrum besteht und im wesentlichen für Ansäuerung, Zerkleinerung und koordinierten Weitertransport der Nahrung an nachfolgende Darmabschnitte zuständig ist<sup>23</sup>(S. 1904).

#### 4.1.1 Rezeptive und adaptative Relaxation

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Relaxation, die für die Aufnahme der Nahrung in den Magen nötig sind, wird über Reflexwege vermittelt, die als rezeptive und adaptative Relaxation bezeichnet werden.

Bei der rezeptiven Relaxation handelt es sich um einen Reflex, der durch Erregung von Mechanorezeptoren im Pharynx und Ösophagus beim Schluckakt initiiert wird und über einen vago-vagalen Reflexweg in einer Relaxation des Magenfundus resultiert. Dabei werden durch die vagalen Efferenzen zwei postganglionäre Neuronentypen im myenterischen Plexus aktiviert:

Zum einen exzitatorische cholinerge Neurone und zum anderen inhibitorische Neurone, die über nicht-adrenerge und nicht-cholinerge (NANC) Mechanismen eine Relaxation des Magens bewirken<sup>1</sup>(S. 50).

Zusätzlich zu diesem Mechanismus, der zu Beginn der Schluckakts aktiviert wird, existiert ein zweiter Reflexweg, der als adaptative Relaxation bezeichnet wird. Dieser wird durch eine Dehnung der Magenwand initiiert, wobei hier die Aktivierung inhibitorischer Neurone, über Reflexbahnen stattfindet, die sowohl über intrinsische, das heißt in der Magenwand gelegene, als auch über extrinsisch vagale Bahnen verschaltet werden<sup>31</sup>(S. 477),<sup>45</sup>(S. 5).

Somit existieren zwei Mechanismen, die eine Aufnahme größerer Nahrungs- und Flüssigkeitsmengen ermöglichen und zu verschiedenen Zeitpunkten des

Schluckakts aktiviert werden und somit synergistisch eine adäquate Relaxation des Magens bei Bedarf gewährleisten.

#### 4.1.2 Nicht-adrenerg nicht-cholinerg (NANC) vermittelte Relaxation

Es zeigte sich, daß diese neuronal vermittelten inhibitorischen Mechanismen weder durch Blocker adrenerger noch durch Blocker cholinergere Effekte zu beeinflussen waren, weswegen diese Form der Relaxation als nicht-adrenerge nicht-cholinerge (NANC) Neurotransmission bezeichnet wurde<sup>1</sup>(S. 50).

So wurde intensiv nach den Transmittern gesucht, die, von den inhibitorischen Neuronen freigesetzt, die Relaxation vermitteln.

Bei der Suche nach dem Transmitter der NANC Relaxation wurden im wesentlichen drei Theorien darüber aufgestellt, welcher Neurotransmitter der entscheidende ist. Diese sind :

- Die nitrerge Theorie mit dem Transmitter Stickstoffmonoxid (NO)
- Die peptiderge Theorie mit dem Vasoaktiven Intestinalen Polypeptid (VIP) als Hauptvertreter
- Die purinerge Theorie mit Adenosintriphosphat (ATP) als Hauptvertreter

Für jeden dieser Transmitterstoffe konnte an unterschiedlichen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts eine spezifische Rolle allein oder in Kombination mit anderen Transmittern nachgewiesen werden.

#### 4.1.2.1 Kriterien für Neurotransmitter

Damit eine Substanz als Neurotransmitter bezeichnet werden kann, müssen nach Christensen und Wingate folgende Kriterien erfüllt sein<sup>22</sup>(S. 388):

- **Synthese:**  
Die postulierte Substanz sollte in Nervenzellen synthetisiert und in Vesikeln der Nervenendigungen gespeichert werden.
- **Meßbare Freisetzung:**  
Die Substanz muß in meßbaren Mengen über einen calciumabhängigen Mechanismus durch Nervenstimulation freigesetzt werden.
- **Identität der Wirkung:**  
Der postulierte Neurotransmitter sollte bei exogener Zugabe den bei neuronaler Stimulation erzielten Effekt kopieren können.
- **Inaktivierung:**  
Es sollte ein physiologischer Inaktivierungsmechanismus für den postulierten Neurotransmitter existieren, z.B. Wiederaufnahme oder Spaltung in inaktive Metabolite.
- **Blockierbarkeit:**  
Spezifische Blocker der Substanz sollten den Effekt des Neurotransmitters blockieren können.

#### 4.1.2.2 Die purinerge Hypothese

Eine Beteiligung des Purins Adenosintriphosphat (ATP) an der NANC vermittelten Relaxation wurde von Burnstock aufgezeigt<sup>18</sup>(S. 337).

So zeigte sich durch die Zugabe von ATP am Magen der Ratte eine biphasische Antwort, die durch eine schnelle kurz dauernde Relaxation, gefolgt von einer länger anhaltenden Kontraktion, gekennzeichnet war<sup>18</sup>(S. 337).

Dies beobachteten auch andere Arbeitsgruppen<sup>55</sup>(S. 203),<sup>56</sup>(S. 78).

Dabei wird der exzitatorische Effekt von ATP wahrscheinlich über eine Stimulation der Prostaglandinsynthese bewirkt, da die Zugabe von Indomethacin als Prostaglandinsynthesehemmer die Kontraktion verhindert<sup>55</sup>(S. 207) und die kontrahierende Komponente nach ATP Zugabe fehlt, sofern die Muskelstreifen bereits mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  vorkontrahiert wurden<sup>9</sup>(S. 225).

Die ATP induzierte Relaxation wird über eine Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanälen mit niedriger Leitfähigkeit vermittelt, da nach Zugabe von Apamin, einem aus Bienengift gewonnenem Inhibitor dieser  $K^+$ -Kanäle, die inhibitorische Antwort von ATP am Magenfundus der Ratte komplett blockiert wurde<sup>56</sup>(S. 78).

Die durch elektrische Feldstimulation induzierte Relaxation hingegen wird durch Apamin nicht beeinflusst<sup>56</sup>(S. 78), obwohl durch elektrische Feldstimulation eine Tetrodotoxin sensitive, also neuronal vermittelte, meßbare ATP Freisetzung beobachtet wurde<sup>9</sup>(S. 225), was gegen eine wesentliche Beteiligung der Purine an der NANC vermittelten Relaxation im Magenfundus der Ratte spricht. Dabei muß erwähnt werden, daß auch Arbeiten existieren, die eine Reduktion des durch elektrische Feldstimulation erzielten inhibitorischen Effekt durch Apamin feststellen<sup>49</sup>(S. 403).

Für ATP als Neurotransmitter der NANC vermittelten Relaxation sprechen also seine meßbare Freisetzung aus Neuronen (elektrische Feldstimulation) und die Blockierbarkeit durch spezifische Inhibitoren (Apamin, Indomethacin), während zu der  $Ca^{2+}$  abhängigen ATP Freisetzung keine definitiven Daten existieren.

#### 4.1.2.3 Die peptiderge Theorie

Als Vertreter der peptidergen Theorie wurde als Transmitter der NANC vermittelten Relaxation das aus 28 Aminosäuren bestehende vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) postuliert, für das 1970 erstmals auch ein inhibitorischer Effekt auf die glatte Darmmuskulatur gezeigt werden konnte<sup>67</sup>(S. 1144).

Später konnte die Beteiligung von VIP an der NANC Relaxation unter anderem auch im Magenfundus der Ratte aufgezeigt werden<sup>12</sup>(S. 111),<sup>29</sup>(S. 174),<sup>49</sup>(S. 404),<sup>52</sup>(S. 110).

Auch konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige, Tetrodotoxin sensitive VIP Freisetzung durch elektrische Feldstimulation am Magenfundus der Ratte gezeigt werden<sup>28</sup>(S. 693), was ein Kriterium für die Anerkennung als Neurotransmitter ist. Auch im Antrum des Rattenmagens konnte durch elektrische Feldstimulation eine VIP Freisetzung gemessen werden<sup>9</sup>(S. 225).

Zur weiteren Charakterisierung des VIP Effekts wurde nach spezifischen Inhibitoren gesucht. Der Einsatz von 4Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup> als VIP Rezeptorantagonist zeigte keine Reduktion des VIP Effekts<sup>30</sup>(S. 712).

Die Verwendung eines spezifischen VIP Antiserums hingegen zeigte eine signifikante Reduktion der durch elektrische Feldstimulation induzierten Relaxation und eine komplette Blockade der durch exogen zugegebenes VIP erzielten Relaxation<sup>30</sup>(S. 711). Außerdem konnte die VIP Wirkung, sowohl bei durch elektrische Feldstimulation erzielter VIP Freisetzung als auch durch exogene Zugabe, durch Trypsin, einer VIP inaktivierenden Peptidase geblockt werden<sup>12</sup>(S. 112),<sup>27</sup>(S. 176). Dies spricht für eine Beteiligung von VIP an der NANC vermittelten Relaxation.

Als inhibitorischer Neurotransmitter im Gastrointestinaltrakt kommt auch das aus der Hypophyse isolierte Peptid PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) in Frage. PACAP ist ein 38 Aminosäuren zählendes Peptid, von dem auch ein stoffwechselaktives aus 27 Aminosäuren bestehendes Fragment zur Charakterisierung des PACAP Effektes eingesetzt wird. PACAP enthaltende Nervenfasern wurde bei zahlreichen Spezies in unterschiedlichen Darmabschnitten gefunden. Während beim Menschen in allen Darmwandschichten PACAP enthaltende Neurone nachgewiesen werden

konnten, zeigt sich bei der Ratte eine auffallend hohe PACAP-Neuronendichte in der Magenmukosa<sup>78</sup>(S. 439). Bei den bisher identifizierten Rezeptoren für PACAP ist der sogenannte VIP/PACAP II Rezeptor entdeckt worden, der eine äquivalente Affinität für VIP und PACAP besitzt, was für eine enge physiologische Interaktion der beiden Peptide spricht<sup>74</sup>(S. 476). Neben diesen Gemeinsamkeiten existieren jedoch für die beiden Peptide auch einige markante Unterschiede: PACAP besitzt an Taenia-Caeci-Streifen des Meerschweinchens eine dem VIP ähnlich potente inhibitorische Wirkung<sup>75</sup>(S. 511) während es am Ileum der Ratte die fünfzigfache VIP Potenz besitzt<sup>50</sup>(S. 587). Erwähnenswert ist auch, daß der relaxierende Effekt von PACAP an Taenia-Caeci-Streifen des Meerschweinchens durch Apamin blockierbar ist, während der VIP Effekt dadurch unbeeinflusst bleibt<sup>75</sup>(S. 511). Die mit VIP vergleichbare Wirkung an einigen Lokalisationen im Gastrointestinaltrakt sowie die Existenz eines gemeinsamen VIP/PACAP Rezeptors legt eine bedeutende Rolle von PACAP nahe und die Interaktion mit VIP scheint eine bedeutende physiologische Rolle zu spielen.

Als weiterer peptiderger Neurotransmitter konnte das Peptid "Peptide Histidine Isoleucin (PHI)" identifiziert werden das aus 27 Aminosäuren besteht, mit VIP 13 Aminosäuren gemeinsam hat und aus demselben Vorläufermolekül synthetisiert wird<sup>79</sup>(S. 6603). Die Freisetzung von PHI mittels elektrischer Feldstimulation konnte auch am Magenfundus der Ratte gezeigt werden<sup>24</sup>(S. 545). Auch für PHI zeigte sich ein inhibitorischer Effekt auf den Magenfundus der Ratte, der jedoch nur maximal 1/30 der VIP Wirkung erzielen konnte<sup>26</sup>(S. 216).

Zusammenfassend konnte für VIP also eine Beteiligung als potenter inhibitorischer Transmitter der NANC Relaxation im Magenfundus der Ratte aufgezeigt werden, wobei es die erforderlichen Kriterien für die Anerkennung als Neurotransmitter erfüllt. Dies sind die  $Ca^{2+}$  abhängige Freisetzung aus neuronalen Strukturen und die Blockierbarkeit des Effekts durch spezifische Inhibitoren.

#### 4.1.2.4 Die nitric oxide Theorie

Stickstoffmonoxid (NO) wurde bereits 1980 im vaskulären System als ein vom Endothel freigesetzter Botenstoff, der die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert,

entdeckt und als Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) bezeichnet<sup>36</sup>(S. 373). Nachfolgende Studien konnten zeigen, daß dieser Stoff identisch mit NO ist, eine Entdeckung, die 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde<sup>43</sup>(S. 9265).

Später konnte auch im Gastrointestinaltrakt ein inhibitorischer Einfluß von NO auf die glatte Darmmuskulatur gezeigt werden. Zuerst am M. anococcygeus der Ratte<sup>58</sup>(S. 933), darauf auch an verschiedenen Lokalisationen und Spezies<sup>69</sup>(S. 660), so auch an der ileocolonischen Junction des Hundes<sup>11</sup>(S. 241) und im Magenfundus der Ratte<sup>59</sup>(S. 305).

NO entsteht in Gegenwart von O<sub>2</sub> durch Abspaltung aus der Aminosäure L-Arginin unter Produktion von L-Citrullin. Die Reaktion wird von der NO Synthase katalysiert.

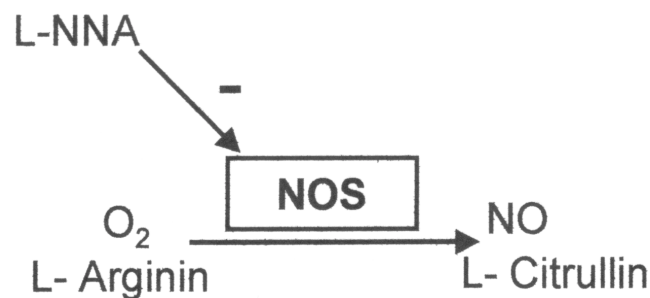


Abb.35: Übersicht über die von der NO-Synthase (NOS) katalysierten Reaktion mit den daran beteiligten Stoffen. Außerdem dargestellt ist der Einfluß des NO Synthase Inhibitors N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA). Inhibitorischer Einfluß ist durch – gekennzeichnet.

Diese Reaktion wird von der NO Synthase (NOS) katalysiert, von der drei Isoenzyme (neuronal NOS(nNOS), endotheliale NOS(eNOS) und induzierbare NOS(iNOS)) bekannt sind.

Die neuronale und die endotheliale NOS (nNOS und eNOS) sind konstitutiv, d.h. daß sie ohne besonderen Induktionsstimulus in der Zelle vorhanden sind und bei Bedarf Ca<sup>2+</sup>/ Calmodulin abhängig aktiviert werden kann.



Die induzierbare NO Synthase (iNOS) ist nicht konstitutiv, sondern wird vor allem durch Endotoxine und Zytokine u.a. in Makrophagen, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und Mikroglia im Rahmen von Entzündungsprozessen de novo synthetisiert. Sie ist  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängig und damit permanent aktiv, so daß sie, einmal in der Zelle gebildet, sehr große Mengen von NO produzieren kann. Ihr kommt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der ausgeprägten, lebensbedrohlichen Hypotension im Rahmen von septischen Zuständen zu<sup>62</sup>(S. 127).

Zum Nachweis der Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) als Neurotransmitter bei der nicht-adrenerg nicht-cholinerg (NANC) vermittelten Relaxation sind wiederum spezifische Inhibitoren nötig.

Dabei gibt es die Möglichkeit die Synthese zu blockieren, die Freisetzung zu verhindern, die Inaktivierung zu beschleunigen oder die Wirkung am Effektororgan zu verhindern.

Am häufigsten werden aufgrund ihrer hohen Spezifität Inhibitoren der NO-Synthase verwendet. Im einzelnen sind dies  $\text{N}\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA), das aus durch nicht-enzymatische Umwandlung aus dem ebenfalls einsetzbaren  $\text{N}\omega$ -Nitro L-Arginin Methyl-Ester (L-NAME) gebildet wird<sup>37</sup>(S. 1807) und das zuerst verwendete, wenig potente  $\text{N}\omega$ -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)<sup>69</sup>(S. 663), die allesamt mit L-Arginin um das katalytische Zentrum der NO-Synthase konkurrieren und somit eine NO Abspaltung verhindern<sup>69</sup>(S. 664).

Die Wirkung der NO-Synthase Inhibitoren tritt nicht auf, wenn das jeweilige Enantiomer z.B.  $\text{N}\omega$ -Monomethyl-D-Arginin (D-NMMA) verwendet wird<sup>59</sup>(S. 305). Der inhibitorische Effekt ließ sich durch Zugabe von L-Arginin, nicht jedoch durch D-Arginin antagonisieren, da durch die Zugabe der NO-Synthase mehr von ihrem eigentlichen Substrat zur Verfügung steht und der Inhibitor kompetitiv am katalytischen Zentrum verdrängt wird<sup>59</sup>(S. 306).

Es zeigte sich, daß durch die Zugabe von NO-Synthase Inhibitoren die durch elektrische Feldstimulation mit niedrigen Frequenzen induzierte, schnell einsetzende, kurz anhaltende Relaxation im Magenfundus der Ratte signifikant reduziert wurde<sup>10</sup>(S. 444),<sup>27</sup>(S. 183),<sup>48</sup>(S. 1404),<sup>53</sup>(S. 1443),<sup>59</sup>(S. 305).

Bei der elektrische Feldstimulation mit höheren Frequenzen zeigte sich eine auch nach Zugabe von NO-Synthase Inhibitoren verzögert einsetzende, länger anhaltende Relaxation, die wahrscheinlich über eine Freisetzung von Peptiden (u.a. VIP) vermittelt wird<sup>27</sup>(S. 183).

Ferner zeigte sich auch für NO eine TTX sensitive,  $Ca^{2+}$  abhängige Freisetzung in Magenfundus der Ratte<sup>25</sup>(S. 720).

Somit ist NO als Neurotransmitter anzuerkennen und ist wohl entscheidend an der NANC vermittelten Relaxation im Magenfundus der Ratte maßgeblich beteiligt.

Es spricht vieles dafür, daß das Zusammenspiel von Stickstoffmonoxid (NO) und vasoaktivem intestinalem Polypeptid (VIP) entscheidend bei der NANC vermittelten Relaxation ist, wobei NO für den schnellen Beginn, VIP für die Aufrechterhaltung der Relaxation verantwortlich ist.

#### 4.1.2.5 Interstitial cells of Cajal

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Cajal im GI Trakt fusiforme und sternförmige Zellen, die einen prominenten Nukleus und variköse Ausläufer aufwiesen, zwischen Nervenendigungen und Effektorzellen lagen und eine Art Netzwerk bildeten<sup>19</sup>(S. 217). Cajal postulierte, daß diese Zellen eine besondere Art von Neuronen seien, die eine Rolle bei der Neurotransmission spielen<sup>19</sup>(S. 217).

Sie wurden später nach ihrem Erstbeschreiber als interstitielle Zellen nach Cajal ( ICC ) bezeichnet

Es wurde später um 1950 von Taxi gezeigt, daß diese Zellen weder Neurone noch Schwann-Zellen waren, trotzdem aber wurde postuliert, daß diese Zellen, die eine enge Lagebeziehung zu varikösen Nervenendigungen aufweisen, eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission spielen<sup>80</sup>(S. 6603).

So konnte von Thuneberg gezeigt werden, daß die ICC eine spontane Rhythmizität aufweisen und verantwortlich für die Generierung von bestimmten Potentialschwankungen, sogenannten "slow waves" sind, die äußerst wichtig für die gastrointestinale Motilität sind. Diese "slow waves" werden durch Tetrodotoxin, einem Blocker neuronaler Übertragung, nicht beeinflusst Auch

konnte er zeigen, daß die ICC reich an Mitochondrien sind, was für eine stoffwechselaktive Rolle bei der Motilitätsentstehung spricht<sup>81</sup>(S. 1).

Als Bindeglied zwischen ICC und Muskulatur wurden "gap junctions" zwischen den beiden Zelltypen entdeckt, die als Übertragungsweg elektrischer Impulse postuliert wurden<sup>33</sup>(S. 157).

Den ICC gemeinsam ist die Expression des sogenannten cKIT Rezeptors, der ein Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität und ein Protoonkogen ist. Der für cKIT codierende Genabschnitt, der sog. W Locus liegt bei der Maus auf Chromosom 5. Es gelang Mäuse zu züchten, die eine Mutation an dem entsprechenden Locus aufwiesen, so daß die Tiere überlebten, aber kein cKIT mehr exprimierten. Die hinsichtlich des W Locus heterozygoten Tiere (W/Wv) fallen durch ein Fehlen bestimmter ICC-Klassen auf. Daraus ergibt sich das Verschwinden normalerweise vorhandener "slow wave" Potentiale, verbunden mit einem abnormen intestinalen Motilitätsmuster<sup>16</sup>(S. 12009).

Dies ist zu vereinbaren mit den Untersuchungen, daß das Verschwinden von "slow waves" mit Apprärparation der ICC enthaltenden Darmschichten v.a. zwischen Längs- und Ringmuskulatur sowie durch eine (relativ unspezifische) pharmakologische Blockierung der ICC durch Methylenblau erzielt werden kann<sup>72</sup>(S. 493).

Die ICC scheinen also mittels der Generierung von "slow wave" Potentialen essentiell für die Entstehung gastrointestinaler Motilität zu sein.

Mittels Immunreaktivität gegen den cKit Rezeptor konnte die Verteilung der ICC im GI Trakt genauer spezifiziert werden.

So konnten z.B. beim Meerschweinchen bisher sechs verschiedene Typen von ICC in unterschiedlichen Darmabschnitten und Wandschichten identifiziert und charakterisiert werden<sup>15</sup>(S. 13).

#### 4.1.2.5.1 Rolle von ICC bei der NO vermittelten Neurotransmission

Neue Studien haben Hinweise darauf ergeben, daß die ICC eine entscheidende Rolle bei der NO vermittelten Relaxation spielen.

Dies haben Studien am unteren Ösophagus- und Pylorusphinkter<sup>84</sup>(S. 320) sowie am Magen<sup>16</sup>(S. 12010) von W/Wv Mäusen zeigen können. Untersucht

wurde dies mittels der Messung von Muskelkontraktion und der elektrophysiologischen Messung von sog. inhibitorischen Junctions Potentiale an Muskelzellen der entsprechenden Region. Dabei zeigte sich durch die Mutation keine Veränderung der Anzahl NOS enthaltender Neuronen, die mit ihren Endigungen die ICC umgeben.

Jedoch wiesen die Mutanten gegenüber dem Wildtyp eine fast vollständig blockierte Antwort auf die NO induzierte Relaxation bzw. Potentialveränderungen auf und dies sowohl bei EFS induzierter als auch durch exogen zugegebenes NO vermittelter Relaxation<sup>84</sup>(S. 322).

Die ICC scheinen also eine entscheidende Schaltstelle bei der NO vermittelten Relaxation zu sein.

Zur Untersuchung der Magenmotilität in vitro und zur näheren Charakterisierung der zugrundeliegenden Mechanismen wurden zahlreiche Systeme entwickelt. Eine bewährte Methode zur experimentellen Erforschung der Kontraktionsmuster im Magenfundus der Ratte ist die Verwendung von isolierten Muskelstreifen, die von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendet wird und im folgenden näher beschrieben werden soll.

#### 4.1.3 Methodikvergleich

Das von Vane<sup>83</sup>(S. 142) beschriebene System zur Untersuchung von isolierten Muskelstreifen aus dem Magenfundus der Ratte wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen weiterentwickelt, um die nicht-adrenerge nicht-cholinerge Neurotransmission im Magenfundus zu untersuchen.

Dabei zeigen sich hinsichtlich des Versuchsaufbaus viele Gemeinsamkeiten, jedoch auch Unterschiede zwischen den Arbeitsgruppen, die in der folgenden Übersicht dargestellt sind:

Arbeitsgruppe	Lefebvre, De Beurme 1-8	Boeckstaens, De Man 9-12	Li, Rand <sup>15</sup>	Kamata, Sakamoto <sup>13-14</sup>	D'Amato, Curró <sup>16-19</sup>	Allescher, Foellmer
<b>Versuchstiere (Ratte)</b>	Wistar ♀, ♂	Wistar ♀, ♂	Sprague- Dawley ♂	Wistar ♂	Wistar ♀, ♂	Wistar ♂
<b>Gewicht</b>	150- 370 g	150-350 gr	200- 300 g	200-300 g	150- 300 g	250- 350 gr
<b>Vorbehandlung</b>	Reserpin (5mg/kg) i.p. 24 h vor Versuch <sup>1-7</sup>	Reserpin (5mg/kg) i.p. 24 h vor Versuch <sup>9, 10</sup>			Reserpin (5mg/kg) i.p. 24 h vor Versuch <sup>16, 17</sup>	
<b>Abpräparation der Mukosa</b>	Nein	nein	nein	ja	Nein	nein
<b>Streifengröße</b>	1.5- 2 cm ×0,3 cm	1- 1.5 cm × 0,2- 0,3 cm	1.5 cm × 0,3 cm	2 cm × 0,2 cm	2 cm x 0,3 cm	1-1,2cm × 0,3- 0,5 cm
<b>Vorspannung</b>	1 g	Individuell eingestellt	1 g	1 g	1 g	1g
<b>Pufferzusätze</b>	Atropin (1 µM) <sup>1-2, 4-8</sup> , Guanethidin (10 <sup>-6</sup> mol/l) <sup>8</sup> , Albumin (50 mg/l) <sup>7</sup>	Atropin (1 µM), Guanethidin (3 µM) <sup>11</sup>	Atropin (3 µM), Guanethidin (5 µM), Indomethacin (10 µM)	Atropin (1 µM), Guanethidin (1 µM)	Atropin (1 µM), Albumin 1 % <sup>17, 18</sup> , Guanethidin (5 µM) <sup>18, 19</sup>	Atropin (1 µM), Guanethidin (3 µM)
<b>Kontraktionsart</b>	Auxotonisch, Isometrisch <sup>6</sup>	Isometrisch	Isotonisch	Isotonisch	Auxotonisch	Auxotonisch
<b>Äquilibrationszeit</b>	60 min.	45 min. <sup>9</sup> , 60 min. <sup>11</sup>	40 min.	Nicht angegeben	60 min.	30 min.
<b>Prästimulation</b>	PGF <sub>2α</sub> (1 µM) <sup>5, 6, 8</sup> , Serotonin (3 µM) <sup>1, 2, 4, 7</sup> , Carbachol (0,1- 1 µM) <sup>3</sup>	Serotonin (0,1 µM)	Serotonin (10 µM)	Serotonin (1 µM)	Serotonin (3 µM)	Serotonin (0,1 µM)
<b>Dosis, Frequenz-Wirkungsbeziehung</b>	Kumulativ	Kumulativ/ nicht kumulativ	Nicht kumulativ	Kumulativ	Kumulativ	Kumulativ
<b>EFS- Parameter (allgemein)</b>	Supramax. V, 1 ms Pulsdauer	8 V, 1 msec. Pulsdauer, 100 mA <sup>10</sup>	Supramax V (17 V/cm), 1 ms Pulsdauer	50 mA, 1 ms Pulsdauer	Supramax. V, 1 ms Pulsdauer, 120 mA	40 V, 0,5 ms Pulsdauer
<b>EFS- Parameter NO Freisetzung</b>	0.25-8 Hz 5 min. <sup>4, 7, 8</sup> , 0,25-16 Hz 10 sec. <sup>5, 6, 8</sup>	1 Hz 2 min. <sup>10</sup> , 0.5-16 Hz 10 sec. <sup>11</sup>	1-5 Hz 10 sec., 0,5- 1 Hz 3 min.	1- 5 Hz 5 sec. <sup>14</sup>	2 Hz 10 sec. <sup>16, 17</sup> , 0,25- 4 Hz 2 min. <sup>18, 19</sup>	0,5- 4 Hz (10 sec.)
<b>EFS- Parameter VIP Freisetzung</b>	5-32 Hz 2-5 min. <sup>1, 2, 4, 7</sup>	16 Hz 2 min. <sup>10</sup> , 16 Hz 3 min. <sup>11</sup>	5 Hz 3 min.	30 Hz, 20 Impulse <sup>13</sup> , 10- 30 Hz 5 sec. <sup>14</sup>	2 Hz 300 sec. <sup>17</sup> , 8- 32 Hz 2 min. <sup>18, 19</sup>	8-16 Hz (10sec.)

**Quellen:** De Beurme, Lefebvre 1987<sup>1</sup>; De Beurme, Lefebvre 1988<sup>2</sup>; Lefebvre, Burnstock 1990<sup>3</sup>; Lefebvre et. al. 1991<sup>4</sup>; Barbier, Lefebvre 1991<sup>5</sup>; Barbier, Lefebvre 1992<sup>6</sup>; D'Amato et al. 1992<sup>7</sup>; Lefebvre 1998<sup>8</sup>; Boeckstaens et al. 1990<sup>9</sup>; 1992<sup>10</sup>; 1995<sup>11</sup>; Kamata et al. 1988<sup>13</sup>; 1993<sup>14</sup>; Li, Rand 1990<sup>15</sup>; D'Amato et.al. 1992<sup>16</sup>; D'Amato et.al. 1992<sup>17</sup>; Curró et.al. 1994<sup>18</sup>; Curró et. al. 1996<sup>19</sup>.

Tab.26: Übersicht über die von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten Methoden

Die Ausschaltung cholinergere Effekte wird von allen Arbeitsgruppen durch die Zugabe von Atropin, einem selektiven Blocker der m-Cholinorezeptoren in der Konzentration  $10^{-6}$  [mol/l] durchgeführt.

Zur Blockade adrenerger Effekte wird entweder dem Puffer Guanethidin zur Entleerung der adrenergen Speicher *in vitro* zugesetzt, oder die Versuchstiere werden mit einer intraperitonealen Injektion von Reserpin, das Noradrenalin aus den peripheren Nervenendigungen freisetzt, 24 h vor Versuchsbeginn vorbehandelt.

Zur Vorkontraktion der Muskelstreifen werden zumeist Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin) oder Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  eingesetzt.

#### 4.1.3.1 Einsatz von Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin) als Prästimulus

Der Einsatz eines Prästimulus zu Beurteilung ist deshalb nötig, weil der Muskelstreifen während der Äquilibrationsperiode keinen intrinsischen Tonus aufbaut, sondern sogar an Tonus verliert und somit eine differenzierte Beurteilung von inhibitorischen Antworten nicht möglich ist.

5-Hydroxy-Tryptamin wurde 1948 von Rapport aus dem Serum isoliert und aufgrund seiner vasokonstriktorischen Wirkung als Serotonin bezeichnet<sup>70</sup>(S. 1243). Es zeigte sich, daß für Serotonin im Gastrointestinaltrakt Rezeptoren verschiedener Untergruppen existieren, von denen zur Zeit vier Untertypen bekannt sind und daß eine Aktivierung der verschiedenen Rezeptortypen unterschiedliche Wirkung sowohl bei verschiedenen Spezies als auch in verschiedenen Lokalisationen im Gastrointestinaltrakt hat.

Beim Meerschweinchen bewirkt 5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin) sowohl eine Kontraktion, die durch Atropin blockierbar ist, als auch eine Atropin resistente Kontraktion, die wahrscheinlich über eine Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren auf tachykinergen Neuronen vermittelt wird<sup>68</sup>(S. 419).

Bei der Ratte bewirkt Serotonin eine Relaxation des Ösophagus<sup>71</sup>(S. 1067) und Ileums<sup>82</sup>(S. 151), die wahrscheinlich ebenfalls über eine Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren vermittelt wird.

Im Magen der Ratte jedoch bewirkt eine Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren auf cholinergen Neuronen eine Acetylcholin vermittelte Kontraktion, die Atropin-sensitiv ist. Eine Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren auf NANC Neuronen

hingegen bewirkt eine Atropin resistente Kontraktion<sup>4</sup>(S. 408). Auch eine Beteiligung von 5-HT<sub>2B</sub> Rezeptoren, die auf den glatten Muskelzellen lokalisiert sein sollen, wird diskutiert<sup>4</sup>(S. 408).

Serotonin bewirkt also eine Kontraktion, die über einen Atropin insensitive, also nicht cholinergen Mechanismus vermittelt wird, was den Anforderungen des hier verwendeten Systems, das unter NANC Bedingungen arbeiten soll, entspricht.

Neben Serotonin wird zur Untersuchung von NANC vermittelter Relaxation auch das Prostaglandin F<sub>2α</sub> verwendet, das ebenfalls Atropin insensitive Kontraktionen hervorruft und somit auch von einigen Arbeitsgruppen als Prästimulus verwendet wird<sup>53</sup>(S. 1440). Die Zugabe von Prostaglandin F<sub>2α</sub> bewirkt über einen Phospholipase C und Phosphatidylinositol gekoppelten Mechanismus eine über ein Gq Protein vermittelte Kontraktion .

Zur Untersuchung der ATP vermittelten Relaxation wird auch Carbachol, ein Agonist an den muscarinergen Neuronen verwendet, wobei hier jedoch cholinerge Effekte untersucht werden, die in dem hier vorliegenden System jedoch nicht Gegenstand der Untersuchung sind<sup>44</sup>(S. 756).

Erheblich unterscheiden sich die von den verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten Stimulationsparameter, bei denen entweder eine vorwiegend NO bzw. VIP vermittelte Relaxation erzielt wird.

Prinzipiell wird eine NO Freisetzung bei Stimulation entweder mit kurzer Stimulationsdauer (5-10 sec.) bei Frequenzen von 0,25-16 Hz oder durch länger anhaltende Stimulation mit niedrigeren Frequenzen von 0,25-4 Hz erzielt (siehe Tab. 26).

Um eine Peptidfreisetzung zu erzielen, muß mit höheren Frequenzen (10-32 Hz) stimuliert werden. Die Stimulationsdauer variiert hier bei den verschiedenen Arbeitsgruppen zwischen 5 und 300 sec. Eine genauere Übersicht über die unterschiedlichen Stimulationsparameter bietet die später folgende Übersichtstabelle.

Wie bereits beschrieben, lassen sich aber die erzielten Effekte nicht absolut voneinander trennen bzw. ist bei einer Stimulation mit höheren Frequenzen



neben der Peptidfreisetzung initial immer auch ein NO Effekt bei der Relaxation beteiligt<sup>12</sup>(S. 113),<sup>59</sup>(S. 308).

#### 4.1.3.2 Isometrische und isotonische Kontraktion

Bei den von den verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten Modellen werden die Tonusänderungen der Muskelstreifen entweder auxotonisch oder isometrisch aufgezeichnet. Bei allen Versuchen wird dabei von einem stabilen Plateau nach Zugabe des entsprechenden Prästimulus ausgegangen.

Bei den hier durchgeführten Versuchen haben wir nur bei Aufzeichnung von auxotonischen Kontraktion ein stabiles Plateau beobachtet. Das unterschiedliche Kontraktionsmuster ist im Ergebnissteil dargestellt.

Die Untersuchung der glattemuskulären Kontraktionsmuster hat ergeben, daß das Ausmaß der realen Muskelverkürzung von entscheidender Bedeutung ist. An der Trachealmuskulatur des Hundes<sup>77</sup>(S. 520),<sup>60</sup>(S. 1459) und an Muskelzellen aus dem Krötenmagen<sup>85</sup> wurde jeweils eine starke initiale Verkürzung bei Stimulationsbeginn, gefolgt von einer langsameren Verkürzungsrate beobachtet. Wird dem Muskel in der frühen Phase der Kontraktion ein geringer Widerstand geboten, so kann er sich wesentlich stärker verkürzen und somit eine größere Kraft aufbauen als wenn ihm initial ein größerer Widerstand entgegensteht<sup>60</sup>(S. 1459). Eine isometrisch gemessene Kontraktion könnte also auch dem Magen der Ratte eine physiologisch wichtige Verkürzung erschweren und eine erhöhtes Spannungsniveau (s.u.) hervorrufen. Ob sich diese Untersuchungen jedoch ohne weiteres auf das verwendete Modell am Magenfundus der Ratte übertragen läßt ist fraglich, da zum einen die verwendete Muskulatur sowie die Spezies eine andere ist und zum anderen die erwähnten Zeitphasen der Kontraktion in einem sehr kurzen Bereich von 1- 20 sec. abspielen, der sich doch erheblich von den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Intervallen, der sich im Minutenbereich abspielt, unterscheidet.

Außerdem wurde beobachtet, daß bei einer tetanischen Kontraktion der Trachealmuskulatur des Hundes die Rate der sogenannten Querbrückenschläge zwischen den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin, die für den tatsächlichen Kraftaufbau verantwortlich sind, um das vierfache gegenüber einer physiologischen abnimmt<sup>77</sup>(S. 517) und somit ein Kraftverlust

resultiert. Da eine isometrische Kontraktion einer tetanischen Kontraktion eher ähnelt als eine auxotonische, könnte dieser Effekt für den schnellen Plateauverlust bei Aufzeichnung isometrischer Kontraktionen mitverantwortlich sein.

Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Verhalten könnte die physiologische Rolle des Magenfundus sein, obwohl eine direkte Übertragung von in vitro Ergebnissen auf physiologische Verhältnisse nur äußerst begrenzt zulässig ist.

Da der Magenfundus im wesentlichen die Aufgabe hat, große Nahrungsmengen ohne große intraluminale Druckerhöhungen aufzunehmen, muß er sich bei einer zunehmenden Dehnung relaxieren und somit der Druckerhöhung entziehen. Bei der Aufzeichnung von isometrischen Kontraktionen kann sich der Muskelstreifen nicht real verkürzen, er kontrahiert sozusagen frustriert gegen einen unüberwindbaren Widerstand und die Spannung nimmt dabei zu. Als Reaktion darauf relaxiert er sich, was durch den schnellen Tonusabfall nach initialer Spannungszunahme gekennzeichnet ist.

Anders bei der auxotonischen, also der Mischform aus isotonischer und isometrischer Kontraktion, bei der der Muskelstreifen die Möglichkeit hat sich zu verkürzen und somit die Kontraktion ohne große Spannungszunahme ablaufen kann.

Dies entspräche dem Zustand, bei dem der Magen sich einem Füllungszustand anpassen kann, d.h. eine adäquate Spannung vorliegt und der Magen auf diesem Level lange verharren kann, während andere Stoffwechselforgänge ablaufen.

Eine Überstimulation durch eine zu hohe Konzentration von Serotonin scheint wenig wahrscheinlich, da bei Aufzeichnung von auxotonischen Kontraktionen und Verwendung der identischen Serotoninkonzentration ein stabiles Kontraktionsplateau erreicht wird, welches sich über sehr lange Zeit hält. Somit scheint ein pharmakologischer Einfluß von Serotonin wenig wahrscheinlich.

## 4.2 Spezielle Diskussion

Am Magenfundus wurde von den bereits erwähnten Arbeitsgruppen ein breites Spektrum von Untersuchungen angestellt, um die "second messenger" Wege der NANC-Relaxation näher zu charakterisieren. Zur Übersicht der von den verschiedenen Arbeitsgruppen beobachteten Ergebnisse dient die folgende Tabelle:

Relaxation induziert durch:	EFS (NO- Freisetzung)						EFS (VIP Freisetzung)						VIP (exogen)						Adenosintriphosphat (ATP)					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
VIP Antiserum							↓ <sup>2</sup>				↓ <sup>13</sup>		x <sup>2</sup>											
<b>VIP Antagonist</b>							• <sup>2</sup>						• <sup>2</sup>											
VIP- Like Immunoreaktivität	- <sup>7</sup>						+ <sup>7</sup>					+ <sup>17</sup>												
PHI- Like Immunoreaktivität					- <sup>18</sup>							+ <sup>18</sup>												
Trequinsin (PDE III)						•						↑						↑						
Zaprinast (PDE V)					↑		• <sup>5</sup>						•	• <sup>5</sup>				•						
IBMX (unspezifisch PDE)							• <sup>5</sup>						• <sup>5</sup>											
TTX (Neurotransmission)	x <sup>7</sup>	x <sup>10</sup>			x <sup>17</sup>	x	x <sup>7</sup>	x <sup>10</sup>			x <sup>17</sup>	x	• <sup>7</sup>	x										
Trypsin (Peptidase)		• <sup>10</sup>			• <sup>17</sup>		↓ <sup>1</sup>	↓ <sup>10</sup>			↓ <sup>13</sup>		x <sup>1</sup>	x <sup>10</sup>										
L-NNA/ L-NMMA (NOS)	↓ <sup>8</sup>	↓ <sup>9</sup>	↓ <sup>15</sup>	↓ <sup>14</sup>	↓ <sup>17</sup>	↓						• <sup>17</sup>	•	• <sup>9</sup>	↓ <sup>15</sup>		• <sup>17</sup>	•	• <sup>9</sup>				• <sup>17</sup>	
L-Arginin reversibel (NOS)		+ <sup>9</sup>	+ <sup>15</sup>	+ <sup>14</sup>	+ <sup>17</sup>	+																		
LY 83583 (lösl. Guanylatzyklase)	• <sup>6</sup>						• <sup>6</sup>						• <sup>6</sup>											
ODQ (lösl. Guanylatzyklase)	↓ <sup>8</sup>					↓												↓						
KT 5720 (Proteinkinase A)						•												↓						
Indomethacin (Prostaglandin)																							↓ <sup>3</sup>	
Apamin (K <sup>+</sup> - Kanal)	• <sup>4</sup>					•	• <sup>4</sup>				↓ <sup>13</sup>		•	• <sup>4</sup>			↓ <sup>13</sup>					x <sup>4</sup>		

Relaxation induziert durch:	NO- Donor (SNP, NTG, DEA- NO)						Isoprenalin/ Noradrenalin					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
Trequinsin (PDE III)						•						
Zaprinast (PDE V)	↑ <sup>5</sup>						• <sup>5</sup>					
IBMX (unspezifisch PDE)	• <sup>5</sup>						↑ <sup>5</sup>					
TTX (Neurotransmission)												
Trypsin (Peptidase)		• <sup>10</sup>			• <sup>17</sup>			• <sup>10</sup>				• <sup>17</sup>
L-NNA/ L-NMMA (NOS)		• <sup>9</sup>	• <sup>15</sup>		• <sup>17</sup>			• <sup>9</sup>	• <sup>15</sup>			• <sup>17</sup>
L-Arginin reversibel (NOS)												
LY 83583 (lösl. Guanylatzyklase)	↓ <sup>6</sup>						• <sup>6</sup>					
ODQ (lösl. Guanylatzyklase)	↓ <sup>8</sup>					↓	• <sup>8</sup>					

**Legende:**

- ↓ Relaxation wird reduziert
- x Relaxation wird geblockt
- Relaxation bleibt unverändert
- ↑ Relaxation wird verstärkt
- + Effekt vorhanden
- Effekt nicht vorhanden

**Arbeitsgruppen:**

- A** Lefebvre, De Beurme <sup>1-8</sup>
- B** Boeckstaens, De Man <sup>9-12</sup>
- C** Li, Rand <sup>15</sup>
- D** Kamata, Sakamoto <sup>13-14</sup>
- E** D'Amato, Curró <sup>16-19</sup>
- F** Allescher, Foellmer

**Quellen:** De Beurme, Lefebvre 1987 <sup>1</sup>; De Beurme, Lefebvre 1988 <sup>2</sup>; Lefebvre, Burnstock 1990 <sup>3</sup>; Lefebvre et. al. 1991 <sup>4</sup>; Barbier, Lefebvre 1991 <sup>5</sup>; Barbier, Lefebvre 1992 <sup>6</sup>; D'Amato et al. 1992 <sup>7</sup>; Lefebvre 1998 <sup>8</sup>; Boeckstaens et al. 1990 <sup>9</sup>; 1992 <sup>10</sup>; 1995 <sup>11</sup>; Kamata et al. 1988 <sup>13</sup>; 1993 <sup>14</sup>; Li, Rand 1990 <sup>15</sup>; D'Amato et.al. 1992 <sup>16</sup>; D'Amato et.al. 1992 <sup>17</sup>; Curró et.al. 1994 <sup>18</sup>; Curró et. al. 1996 <sup>19</sup>.

Tab.27: Übersicht über die von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachteten Ergebnisse

#### 4.2.1 Einfluß des Inhibitors der NO-Synthase L-NNA

Als Inhibitor der NO Synthase wurde hier das methylierte Arginin Derivat N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA) verwendet, das ein potenter Inhibitor der beiden konstitutiven Isoformen der NO Synthase (eNOS und nNOS) ist<sup>38</sup>(S. 184).

Es zeigte sich hierbei eine potente Reduktion der schnell nach Stimulationsbeginn einsetzenden Relaxation. Diese Form der Relaxation ist sehr wahrscheinlich NO vermittelt<sup>7</sup>(S. 332),<sup>48</sup>(S. )1407,<sup>10</sup>(S. 443),<sup>59</sup>(S. 308).

Dies spricht also für eine wesentliche Beteiligung von NO an der schnell einsetzenden kurz anhaltenden Relaxation, die durch Inhibition der NO Synthase blockierbar ist<sup>25</sup>(S. 720).

Auch eine Beteiligung von ATP in diesem Frequenzbereich ist denkbar, jedoch ist aufgrund der fehlenden Blockierbarkeit durch Apamin, das als Inhibitor Ca<sup>2+</sup> abhängiger K<sup>+</sup> Kanäle die ATP vermittelte Relaxation verhindert<sup>56</sup>(S. 78), eine wesentliche Beteiligung von Purinen an der EFS induzierten Relaxation unwahrscheinlich. Dies entspricht den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Muskelstreifen aus dem Magenfundus<sup>56</sup>(S. 78) sowie aus isolierten Muskelzellen aus dem Magen der Ratte<sup>40</sup>(S. 103), die ebenfalls eine wesentliche Beteiligung der Purine an der durch EFS im niederfrequenten Stimulationsbereich ausschließen konnten.

Für die VIP vermittelte Relaxation wurde bei einigen Arbeitsgruppen eine Blockierbarkeit durch L-NNA festgestellt<sup>59</sup>(S. 305). Auch an isolierten Muskelzellen aus dem Magen der Ratte<sup>46</sup>(S. 473) und an Muskelstreifen aus dem Meerschweinchenmagen<sup>41</sup>(S. 775) zeigte sich eine Blockierbarkeit durch L-NNA.

In der vorliegenden Arbeit wird die durch exogen zugegebenes VIP vermittelte Relaxation durch die Zugabe von N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA) nicht beeinflusst, was auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt wurde<sup>10</sup>(S. 443).

Bei den Versuchen mit elektrischer Feldstimulation zeigte sich jedoch bei der EFS mit VIP Freisetzung (8-16 Hz) ebenfalls eine signifikante Reduktion der Relaxation, die mit den Ergebnissen der exogenen VIP Zugabe nicht übereinstimmen. Mögliche Erklärungen für diesen Effekt sind, daß es in diesem Frequenzbereich zur Überlagerung von NO-und-VIP Effekten kommen kann oder, daß eine theoretische Trennung der Effekte nicht möglich ist. Auch eine

Abschwächung der VIP induzierten Relaxation bei mehreren aufeinanderfolgenden Stimulationen durch z.B. VIP Verarmung, die bereits bei den Kontrollstimulationen zu einem signifikanten Unterschied bei 16 Hz, nicht jedoch bei 8 Hz führten, wäre denkbar. Ein signifikanter Unterschied zwischen drei aufeinanderfolgenden Feldstimulationen wurde auch am Meerschweinchenmagen festgestellt<sup>54</sup>(S. 177). Interessanterweise zeigt sich hier eine Verstärkung der Relaxation bei der zweiten und dritten Feldstimulation. Schließlich könnte bei der Stimulation mit 8 und 16 Hz ein weiterer Transmitter außer VIP in diesem Frequenzbereich freigesetzt werden, der über einen NO abhängigen bzw. L-NNA sensitiven Mechanismus vermittelt wird.

Bei der ANP vermittelten Relaxation hat L-NNA keinen signifikanten Effekt, was für eine Relaxation, die über einen NO-unabhängigen Mechanismus vermittelt wird, spricht. Dagegen gibt es Untersuchungen am Caecum des Meerschweinchens, die eine Vermittlung des ANP Effekts über einen VIP Rezeptor und eine NO Freisetzung, die in einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase resultiert, beobachten<sup>3</sup>(S. 1110).

Dies widerspricht jedoch den von uns beobachteten Ergebnissen, bei denen ANP seine Wirkung über einen L-NNA insensitiven, also NO unabhängigen Mechanismus vermittelt.

Zusammenfassung:

Die beobachteten Ergebnisse sprechen also für eine wesentliche Beteiligung von NO bei der durch EFS mit NO Freisetzung induzierten Relaxation und für eine NO unabhängige Vermittlung der VIP und ANP induzierten Relaxation.

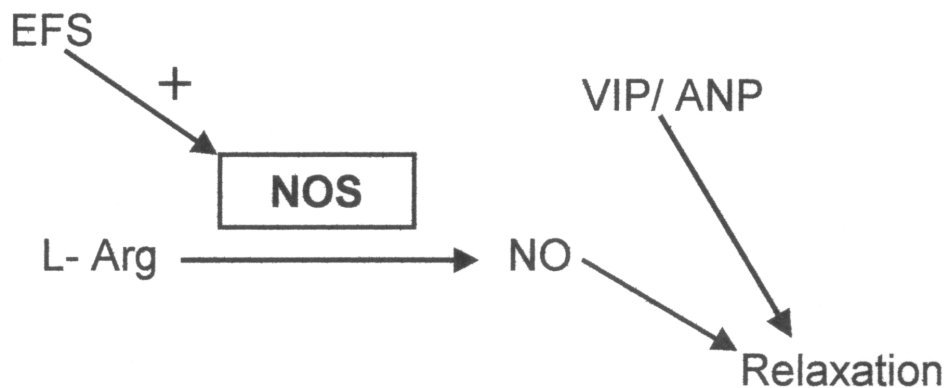


Abb.36: Übersicht über Wirkungsmechanismen von elektrischer Feldstimulation, VIP und ANP auf die NO Synthase (NOS). Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet.

#### 4.2.2 Einfluß des Inhibitors der löslichen Guanylatzyklase ODQ

Die inhibitorische Wirkung von NO wird normalerweise über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt<sup>13</sup>(S. 665). Es gibt auch Hinweise dafür, daß die NO vermittelte Relaxation im Magenfundus der Ratte über eine Erhöhung des cGMP Spiegels vermittelt wird<sup>5</sup>(S. 321).

Zur genaueren Charakterisierung des Relaxationsweges war die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren nötig, die mit Entwicklung von ODQ für die lösliche Guanylatzyklase gelungen scheint<sup>39</sup>(S. 1080).

Bisher wurden unter anderem Methylen Blau und die Substanz 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY 83583) als Inhibitoren der löslichen Guanylatzyklase eingesetzt. Für Methylen Blau zeigte sich jedoch, daß es ebenso einen inhibitorischen Effekt auf die NO Synthase hat<sup>63</sup>(S. 367) und eine Produktion von Superoxid Anionen, die eine Inaktivierung von NO bewirken, stimuliert<sup>61</sup>(S. 170). Ferner bewirkt Methylen Blau eine Relaxation des Magenfundus, was für eine Substanz, die den cGMP Spiegel erniedrigt, schlecht zu erklären ist<sup>47</sup>(S. 205).

Für LY 83583 konnte ebenfalls eine Erniedrigung des cGMP Gehalts festgestellt werden<sup>73</sup>(S. 283). Auch konnte eine inhibitorische Wirkung auf die

NO induzierte Vasorelaxation gezeigt werden<sup>35</sup>(S. 52). Doch wurde auch für LY 83583 eine Superoxidgeneration gezeigt, was wiederum eine NO Deaktivierung bewirkt, aber keine spezifische Inhibition der löslichen Guanylatzyklase<sup>35</sup>(S. 52). Auch eine fehlende Inhibition von EFS und NO induzierter Relaxation im Magenfundus der Ratte spricht gegen eine selektive Inhibition der löslichen Guanylatzyklase<sup>7</sup>(S. 333).

Mit der Entwicklung von ODQ scheint der selektive Inhibitor gefunden zu sein. So blockt ODQ selektiv die NO bzw. cGMP induzierte Relaxation am M. anococcygeus des Hasen<sup>20</sup>(S. 137), am Colon des Kaninchens<sup>34</sup>(S. 1223) und Meerschweinchens<sup>66</sup>(S. 89), Meerschweinchen Trachea sowie am menschlichen Bronchus<sup>32</sup>(S. 1216).

Auch am Magenfundus der Ratte gibt es Hinweise für eine selektive Inhibition der NO induzierten Relaxation durch ODQ<sup>53</sup>(S. 1444).

Bei den eigenen Versuchen zeigte ODQ einen potenten hemmenden Effekt auf die durch EFS freigesetzte NO induzierte Relaxation, sowie auf die DEA NO induzierte Relaxation. Die Reduktion der EFS induzierten Relaxation entsprach dem Ausmaß der hemmenden Wirkung von L-NNA (Tabelle 1). Diese Analogie wurde am Magenfundus der Ratte auch für L-NAME gezeigt<sup>53</sup>(S. 1444).

Die hohe Korrelation zwischen dem inhibitorischen Effekt von L-NNA als Inhibitor der NO Synthase und ODQ als Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase spricht im hohen Maße dafür, daß die NO vermittelte Relaxation im Magenfundus der Ratte über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt wird.

Bei der VIP vermittelten Relaxation zeigte sich kein hemmender Effekt von ODQ auf die induzierte Relaxation. Dies galt sowohl für die durch EFS induzierte als auch für die durch exogene Zugabe von VIP induzierte Relaxation.

Ebenso bei der durch ANP induzierten Relaxation zeigte sich kein inhibitorischer Einfluß von ODQ. Dies wird durch Untersuchungen am M. anococcygeus des Hasen unterstützt<sup>20</sup>(S. 137). Jedoch gibt es auch Untersuchungen am Caecum des Meerschweinchens, die eine Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase an der ANP induzierten Relaxation feststellen<sup>2</sup>(S. 1297). Außerdem gibt es Hinweise dafür, daß der ANP Effekt über eine



Aktivierung der membrangebundenen partikulären Guanylatzyklase (Gz A) vermittelt wird<sup>42</sup>(S. 427).

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die NO vermittelte Relaxation über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase mediiert wird und daß VIP und ANP ihre Wirkung über einen NO- bzw. lösliche Guanylatzyklase unabhängigen Weg entfalten.

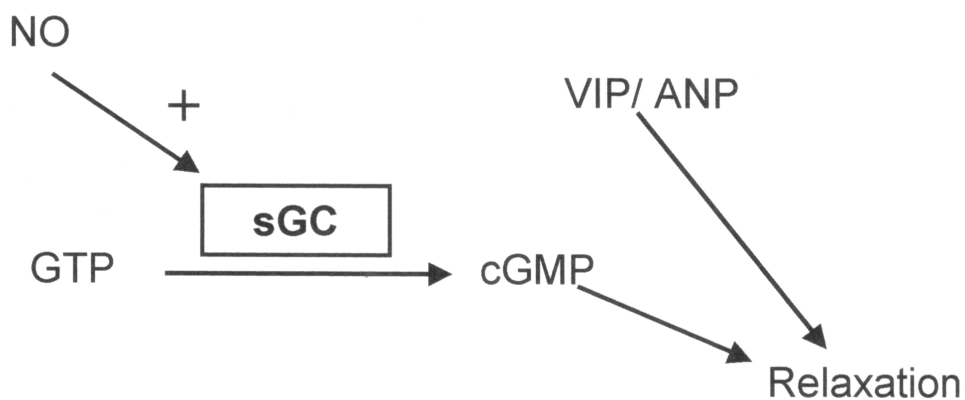


Abb.37: Übersicht über den Einfluß bzw. die Wirkung von NO und VIP/ ANP auf die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet.

#### 4.2.3 Einfluß des Inhibitors der Proteinkinase A KT 5720

Zur Untersuchung von Proteinkinase A vermittelten Effekten werden als Inhibitoren der cAMP abhängigen Proteinkinase A (R)-p-cAMPs und KT 5720 eingesetzt. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß die mit einer Erhöhung des cAMP Spiegels verbundene Relaxation über eine Aktivierung der Proteinkinase A vermittelt wird. Die stimulierte Proteinkinase reduziert dann über eine Modulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Muskelzelle, wodurch das Kontraktionsniveau gesenkt wird und der Muskel sich relaxiert<sup>65</sup>(S. 668).

So geht an isolierten Muskelzellen des Hasen die VIP vermittelte cAMP Erhöhung mit einer Aktivitätssteigerung der cAMP abhängigen Proteinkinase A einher<sup>64</sup>(S. 171). Auch an isolierten Muskelzellen aus dem Meerschweinchen Magen und Colon zeigte sich eine Beteiligung der Proteinkinase A bei der VIP vermittelten Relaxation<sup>46</sup>(S. 470).

Die Beteiligung der cAMP abhängigen Proteinkinase A bei der VIP vermittelten Relaxation wird durch die eigenen Ergebnisse bestätigt, da durch KT 5720 die VIP vermittelte Relaxation signifikant reduziert wird. Auch bei der EFS mit VIP Freisetzung induzierten Relaxation zeigt sich eine signifikante Reduktion des inhibitorischen Einflusses.

Bei der ANP vermittelten Relaxation zeigte sich ebenfalls eine Beteiligung der Proteinkinase A. KT 5720 reduzierte signifikant die ANP vermittelte Relaxation. Dies widerspricht den Untersuchungen am Meerschweinchen Caecum, die keine Beteiligung der cAMP bildenden Adenylatzyklase bei der ANP vermittelten Relaxation feststellen, sondern statt dessen eine direkte Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase bei der ANP vermittelten Relaxation postulieren<sup>2</sup>(S. 1297).

Auf die NO induzierte Relaxation, die über eine Erhöhung des cGMP Spiegels vermittelt wird, hatte KT 5720 keinen Einfluß, was für einen cAMP/ Proteinkinase A unabhängigen Weg bei der Vermittlung des NO Effekts spricht. Dies wurde auch am Magenfundus des Schweins gezeigt<sup>57</sup>(S. 2022).

Zusammenfassung:

Der NO vermittelte Effekt wird über einen Proteinkinase A unabhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt. Die VIP und ANP induzierte Relaxation wird über eine Aktivierung der Proteinkinase A vermittelt.

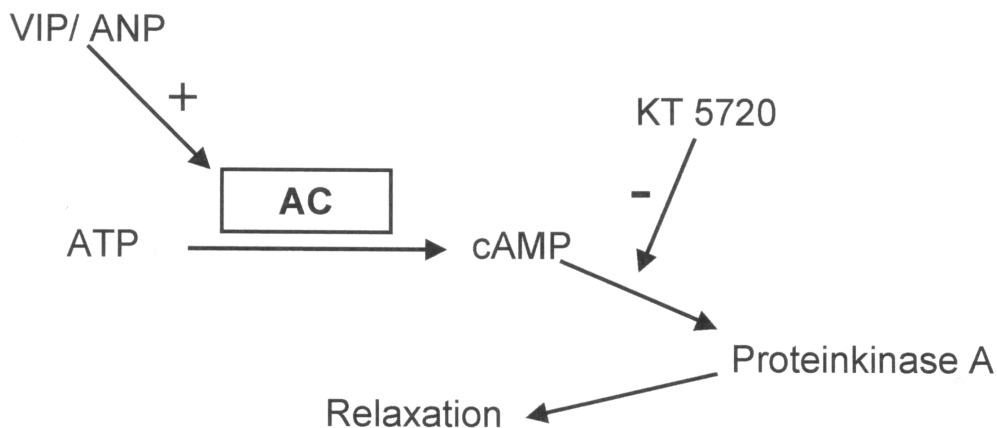


Abb.38: Übersicht über den Einfluß von VIP/ ANP und KT 5720 auf die Adenylatzyklase (AC) und er von ihr katalysierten Reaktion. Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet, inhibitorischer durch -.

#### 4.2.4 Einfluß des Inhibitors der Phosphodiesterase V Zaprinast

Eine Beteiligung der Phosphodiesterasen, von denen zur Zeit sieben Untergruppen bekannt sind<sup>8</sup>(S. 725) an der Regulation verschiedener Stoffwechselprozesse konnte für viele Gewebe gezeigt werden. So auch am Magenfundus der Ratte<sup>5</sup>(S. 318).

Die Phosphodiesterasen, die für den Abbau der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP verantwortlich sind, haben am Darm u.a. die Aufgabe, die durch eine Erhöhung des cGMP/ cAMP Spiegels vermittelte Relaxation in ihrer Wirkung zu limitieren.

Dies zeigt sich in der inhibitorischen Wirkung von Inhibitoren der Phosphodiesterasen auf Muskelstreifen aus dem Magenfundus der Katze<sup>6</sup>(S. 41). Durch eine Reduktion des Abbaus der zyklischen Nukleotide wird deren inhibitorische Wirkung verstärkt.

Am Magenfundus der Ratte konnte eine Beteiligung der cGMP spezifischen Phosphodiesterase V bei der NANC vermittelten Relaxation gezeigt werden, da durch den Inhibitor der Phosphodiesterase V Zaprinast eine Verstärkung der

NO vermittelten Relaxation, die mit einer Erhöhung des cGMP Spiegels einhergeht, gezeigt werden konnte<sup>5</sup>(S. 317). Auf die durch VIP oder den Adenylatzyklasestimulator Isoprenalin induzierte Relaxation zeigte sich kein Einfluß.

Dies ist nur teilweise mit den eigenen Ergebnissen in Einklang zu bringen. Zwar wird durch die EFS mit überwiegender NO Freisetzung eine signifikante Verlängerung des relaxierenden Effekts beobachtet, eine direkte Zugabe Zaprinast bewirkt jedoch nur eine Verstärkung des DEA NO Effektes, die statistisch nicht signifikant ist. Die Diskrepanz zwischen der EFS induzierten NO Freisetzung und der exogenen Zugabe des NO Donors ist überraschend und nicht leicht zu erklären, zumal z.B. bei den Versuchen mit ODQ eine Übereinstimmung der EFS mit der DEA NO induzierten Relaxation vorliegt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zugabe von DEA NO eine zur EFS unterschiedlich schnelle NO Freisetzung bewirkt, die in einer unterschiedlich schnellen Deaktivierung durch die PDE V resultiert. Denkbar wäre auch, daß durch DEA NO gegenüber der EFS induzierten NO Freisetzung nur eine submaximale cGMP Stimulation stattfindet, die durch Zaprinast nicht signifikant beeinflussbar ist.

Möglich ist es auch, daß neben der PDE V noch andere bedeutende Mechanismen zur Limitierung der NO induzierten Relaxation vorhanden sind, der PDE V Effekt also relativ schwach ist und so bei dem exogen zugegebenen NO Donor DEA NO der Effekt nur nicht ausreichend zu messen ist. Das wäre vereinbar mit der vorhandenen, aber nicht signifikanten Verstärkung der Relaxation.

Bei der VIP induzierten Relaxation hat jedoch auch in den eigenen Versuchen Zaprinast keinen Einfluss auf die Relaxation, was dafür spricht, dass bei der VIP induzierten Relaxation cGMP abhängige Mechanismen keine Rolle spielen.

Zusammenfassung:

Die durch NO induzierte Relaxation wird durch die Phosphodiesterase V in ihrer Wirkung limitiert, während die VIP induzierte Relaxation unbeeinträchtigt bleibt.

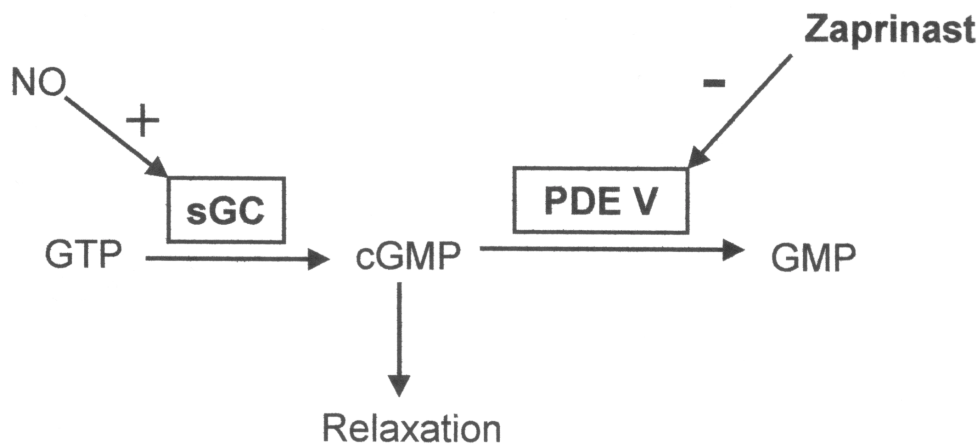


Abb.39: Übersicht über den Einfluß von Zaprinast auf die Phosphodiesterase V (PDE V) bzw. der von ihr katalysierten Reaktion. sGC steht für lösliche Guanylatzyklase. Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet, inhibitorischer durch -.

#### 4.2.5 Inhibitor der Phosphodiesterase III Trequinsin

Weniger eindeutig sind die Beobachtungen des Inhibitors der cGMP inhibierten cAMP spezifischen Phosphodiesterase III Trequinsin. Unter normalen Bedingungen wird die PDE III durch erhöhte cGMP Spiegel an der Inaktivierung des stoffwechselaktiven cAMP gehindert. Theoretisch bedeutet dies, daß erhöhte cGMP Spiegel, zum Beispiel über eine NO vermittelte Reaktion, eine cAMP vermittelte Relaxation verlängern. Trequinsin und NO haben also theoretisch einen vergleichbaren Einfluß auf die PDE III.

Am Magenfundus der Katze zeigte die Zugabe eines Inhibitors der Phosphodiesterase III (SKF 94120) interessanterweise keinen Einfluß auf die durch NO, VIP und EFS mit VIP Freisetzung induzierte Relaxation<sup>6</sup>(S. 41). Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von Trequinsin an der Trachealmuskulatur des Meerschweinchens eine konzentrationsabhängige Relaxation<sup>7</sup>(S. 953).

Trequinsin zeigte als spezifischer Inhibitor der Phosphodiesterase III einen Effekt, der mit einer Potenzierung der VIP induzierten Relaxation, die über einen cAMP abhängigen Mechanismus vermittelt wird, vereinbar ist. Ebenso auf

die EFS mit einer vorwiegenden NO (2 Hz) bzw. VIP (8 Hz) Freisetzung hatte Trequinsin eine Verlängerung der erzielten Relaxation zur Folge.

Für diesen Effekt gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Klar scheint, daß der durch VIP vermittelte Effekt, der mit einer cAMP Erhöhung einhergeht, durch Blockade einer cAMP spezifischen Phosphodiesterase in ihrer Wirkung verlängert wird.

Schwerer zu erklären ist der Effekt bei einer Stimulation mit 2 Hz, bei dem von einer vorwiegend NO vermittelten Relaxation auszugehen ist, die über eine cGMP, nicht jedoch eine cAMP Erhöhung vermittelt wird. Möglich wäre eine durch die dominante NO Wirkung normalerweise maskierte VIP vermittelte Relaxation auch im niedrigen Frequenzbereich, die durch den verzögerten Abbau des cAMP Spiegels unter dem Einfluß von Trequinsin zum Tragen kommt. Ferner wäre eine bislang kaum belegte cAMP Bildung direkt durch NO möglich.

Auch die Beteiligung eines bisher nicht benannten Neurotransmitters, der seine Wirkung über eine cAMP Erhöhung entfaltet, wäre denkbar.

Zusammenfassung:

Die Rolle der PDE III und der Einfluss des PDE III Inhibitors Trequinsin ist in dem folgenden Schaubild dargestellt.

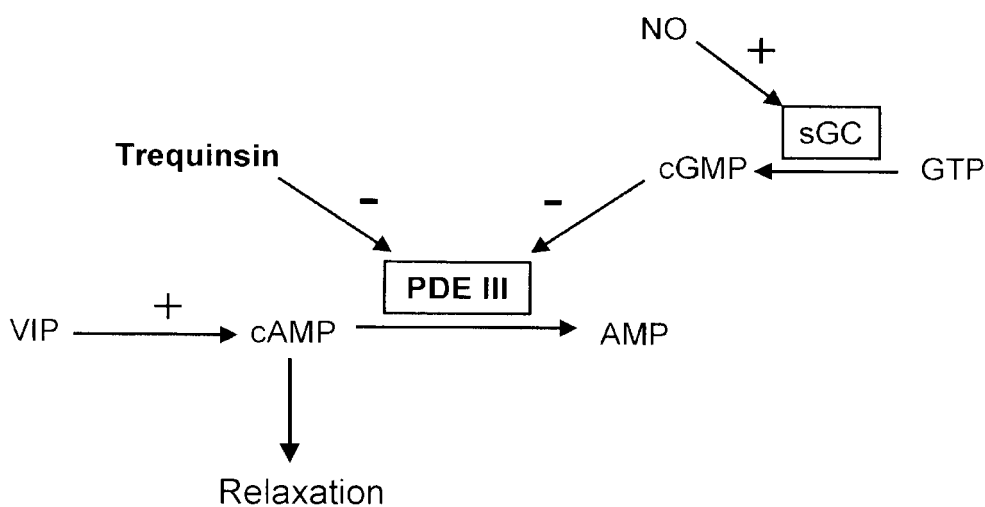


Abb.40: Übersicht über den inhibitorischen Einfluß von Trequinsin bzw. cGMP auf die Phosphodiesterase III (PDE III) bzw. der von ihr katalysierten Reaktion. sGC steht für lösliche Guanylatzyklase. Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet, inhibitorischer durch -.

So bleiben auch nach dieser Arbeit die Mechanismen der NANC-vermittelten Relaxation im Magenfundus nicht vollständig geklärt und es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die Reaktionswege vollständig zu verstehen und sich die gewonnenen Erkenntnisse für klinisch verwertbare Strategien zu Nutze machen zu können.

## 5. Zusammenfassung der Arbeit

Hintergrund:

Ziel dieser Arbeit soll es sein, die inhibitorischen Mechanismen der nicht-adrenerg-nicht-cholinerg (NANC) vermittelten Relaxation im Magenfundus, die für eine koordinierte Aufnahme und Weiterleitung der in den Magen aufgenommenen Speisen von entscheidender Bedeutung sind, anhand isolierter Muskelstreifen aus dem Magenfundus der Ratte weiter zu charakterisieren.

Methoden:

Es wurden isolierte Muskelstreifen aus dem Magenfundus von männlichen Wistar Ratten in ein mit Carbogen begastes Krebs-Ringer-Puffer Bad von 37.0 Celsius eingebracht und die Kontraktionen mittels isometrischer und auxotonischer Aufzeichnung gemessen. Die Relaxation der mit Serotonin vorstimulierten Muskelstreifen wurde mittels elektrischer Feldstimulation (EFS) und durch exogene Zugabe von vasoaktivem intestinalen Polypeptid (VIP), atrialem natriuretischem Peptid (ANP) sowie dem NO Donor DEA-NO induziert. Zur statistischen Auswertung wurde die Varianzanalyse (One way ANOVA) und der student t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% festgelegt.

Ergebnisse:

Bei der EFS induzierten Relaxation unter Stimulationbedingungen, in denen vorwiegend ein NO vermittelter Effekt vorliegt (0.5-4 Hz), wird die Relaxation signifikant durch den Inhibitor der NO Synthase L-NNA sowie durch den Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase ODQ reduziert, während der Inhibitor der Proteinkinase A KT 5720 keinen signifikanten Einfluß hat. Der Inhibitor der cGMP spezifischen Phosphodiesterase V Zaprinast bewirkt eine Verlängerung der Relaxation während der Inhibitor der cGMP inhibierten cAMP spezifischen Phosphodiesterase III Trequinsin keinen signifikanten Effekt zeigt.



Bei EFS in Frequenzbereichen, in denen vorwiegend eine peptidvermittelte (dominant VIP) Relaxation stattfindet (8-16 Hz), haben L-NNA und ODQ keinen signifikanten Einfluß auf die Relaxation, während KT 5720 eine signifikante Reduktion der Relaxation bewirkt. Unter diesen Bedingungen hat Zaprinast keinen Einfluss, während Trequinsin eine signifikante Verlängerung der Relaxation bewirkt.

Der Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Kaliumkanäle mit niedriger Leitfähigkeit Apamin, über die Purine wie ATP ihre Wirkung entfalten, hat unter keinen Stimulationsbedingungen einen Effekt auf die EFS induzierte Relaxation.

Auf die durch exogen zugegebenes vasoaktives intestinales Polipeptid (VIP) und atriales natriuretisches Peptid (ANP) induzierte Relaxation haben L-NNA, und ODQ keinen signifikanten Einfluß, während KT 5720 jeweils eine signifikante Reduktion der Relaxation bewirkt.

Die VIP induzierte Relaxation wird durch Trequinsin, nicht jedoch Zaprinast verstärkt.

Die durch exogen zugegebenes NO (DEA-NO) erzielte Relaxation wird durch ODQ, nicht jedoch durch Trequinsin reduziert. Zaprinast bewirkt eine Verstärkung der Relaxation, die aber nicht statistisch signifikant ist.

Konklusion:

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die NO induzierte Relaxation über einen cGMP abhängigen Reaktionsweg mittels Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt wird. Der Mechanismus ist cAMP unabhängig und wird von der cGMP spezifischen PDE V limitiert, während die cGMP inhibierte cAMP spezifische PDE III eine untergeordnete Rolle spielt.

Die durch VIP und ANP vermittelte Relaxation wird über einen cAMP abhängigen Mechanismus realisiert, während cGMP abhängige Reaktionswege nicht wesentlich beteiligt sind. Auf die VIP induzierte Relaxation wirkt die PDE III als modulierender bzw. limitierender Faktor.

Eine Beteiligung der Purine, wie z.B. ATP, an der EFS vermittelten Relaxation scheint nicht vorzuliegen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abrahamsson A. Non- adrenergic non- cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1986; 280:50-61.
2. Akiho H, Chijiwa Y, Okabe H, Harada N, Nawata H. Direct inhibitory effect of atrial natriuretic peptide on isolated caecal circular smooth muscle cells via soluble guanylate cyclase. Life Sci. 1994; 55:1293-1299.
3. Akiho H, Chijiwa Y, Okabe H, Harada N, Nawata H. Interaction between atrial natriuretic peptide and vasoactive intestinal peptide in guinea pig cecal smooth muscle. Gastroenterology. 1995; 109:1105-1112.
4. Amemiya N, Hatta S, Takemura H, Ohshika H. Characterization of the contractile response induced by 5-methoxytryptamine in rat stomach fundus strips. Eur.J.Pharmacol. 1996; 318:403-409.
5. Barbier AJ, Lefebvre RA. Effect of 3-isobutyl-1-methylxanthine and zaprinast on non- adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus. Eur.J.Pharmacol. 1992; 210:315-323.
6. Barbier AJ, Lefebvre RA. Relaxant influence of phosphodiesterase inhibitors in the cat gastric fundus. Eur.J.Pharmacol. 1995; 276:41-47.
7. Barbier AJM, Lefebvre RA. Effect of LY 83583 on relaxation induced by non- adrenergic non- cholinergic nerve stimulation and exogenous nitric oxide in the rat gastric fundus. Eur.J.Pharmacol. 1992; 219:331-334.
8. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol.Rev. 1995; 75:725-748.
9. Belai A, Lefebvre RA, Burnstock G. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats. Eur.J.Pharmacol. 1991; 194:225-234.
10. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bogers JJ, Bult H, De Man JG, Oosterbosch L, et al. Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. J.Pharmacol. Exp.Ther. 1991; 256:441-447.
11. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bult H, De Man JG, Herman AG, Van Maercke YM. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ileocolonic junction. Eur.J.Pharmacol. 1990; 190:239-246.

12. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, De-Man JG, Bult H, Herman AG, Van-Maercke YM. Evidence for a differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide by nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1992; 318:107-115.
13. Bowman A, Drummond AH. Cyclic GMP mediates neurogenic relaxation in the bovine retractor penis muscle. *Br. J.Pharmacol.* 1995; 81:665-674.
14. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordeans FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345:346-347.
15. Burns AJ, Herbert TM, Ward SM, Sanders KM. Interstitial Cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* 1997; 290:11-20.
16. Burns AJ, Lomax AEJ, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM. Interstitial Cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; 93:12008-12013.
17. Burnstock G. The non-adrenergic non-cholinergic nervous system. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 1986; 280:1-15.
18. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. 1970 [classical article]. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 120:337-357.
19. Cajal SR. Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. *CR. Soc. Biol. (Paris)* 1893; 45:217-223.
20. Celtek S, Kasakov L, Moncada S. Inhibition of nitrenergic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. *Br.J.Pharmacol.* 1996; 118:137-140.
21. Chijiwa Y, Kabemura T, Misawa T, Kawakami O, Nawata H. Direct inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide and atrial natriuretic peptide on gastric smooth muscle cells via different mechanisms. *Life Sci.* 1992; 50:1615-1623.
22. Christensen J, Wingate DL. A guide to gastrointestinal motility. Wright PSG, Bristol 1983; 388-394.
23. Code CF, Carlson HF. Motor activity of the stomach. *Handbook of physiology Section 6: Alimentary Canal Volume 4 Motility* American Physiological Society, Washington, D.C.1968 1968; 1903-1916.

24. Curró D, Preziosi P, Ragazzoni E, Ciabattoni G. Peptide histidine isoleucine immunoreactivity release from the rat gastric fundus. *Br.J.Pharmacol.* 1994; 113:541-549.
25. Curró D, Volpe AR, Preziosi P. Nitric oxide synthase activity and non-adrenergic non- cholinergic relaxation in the rat gastric fundus. *Br.J.Pharmacol.* 1996; 117:717-723.
26. D'Amato M, Curro D, Ciabattoni G, Lefebvre RA. Is peptide histidine isoleucine an inhibitory nonadrenergic noncholinergic neurotransmitter in the rat gastric fundus? *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 1990; 303:216-231.
27. D'Amato M, Curro D, Montuschi P. Evidence for dual components in the non-adrenergic non- cholinergic relaxation in the rat gastric fundus: role of endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. *J.Auton.Nerv.Syst.* 1992; 37:175-186.
28. D'Amato M, Curro D, Montuschi P, Ciabattoni G, Ragazzoni E, Lefebvre RA. Release of vasoactive intestinal polypeptide from the rat gastric fundus. *Br. J.Pharmacol.* 1992; 105:691-695.
29. De Beurme FA, Lefebvre RA. Influence of alpha- chymotrypsin and trypsin on the non adrenergic non cholinergic relaxation in the rat gastric fundus. *Br.J.Pharmac.* 1987; 91:171-177.
30. De Beurme FA, Lefebvre RA. Vasoactive intestinal polypeptide as possible mediator of relaxation in the rat gastric fundus. *J.Pharm.Pharmacol.* 1988; 40:711-715.
31. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement o f nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accomodate food or fluid. *Nature* 1991; 351:477-479.
32. Ellis JL. Role of soluble guanylyl cyclase in the relaxations to a nitric oxide donor and to nonadrenergic nerve stimulation in guinea pig trachea and human bronchus. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997; 280:1215-1218.
33. Fausson- Pellegrini MS, Cortesini C, Romagnoli P. Sull'ultrastruttura della tunica muscolare della prozione cardiaca dell'esofago e dello stomaco umano con particolare riferimento alle cosiddette cellule inerziali di Cajal. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 1977; 82:157-177.
34. Franck H, Sweeney KM, Sanders KM, Shuttleworth CWR. Effects of a novel guanylate cyclase inhibitor on nitric oxide-dependent neurotransmission in canine proximal colon. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 122:1223-1229.

35. Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium- dependent and - independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 28:52-59.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
37. Furfine ES, Carbine K, Bunker S, Tanoury G, Harmon M, Laubach V, et al. Potent Inhibition of human neuronal nitric oxide synthase by NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester results from contaminating NG-Nitro-L-Arginine. *Life Sci.* 1997; 60:1803-1809.
38. Furfine ES, Carbine K, Bunker S, Tanoury G, Harmon M, Laubach V, et al. Potent inhibition of human neuronal nitric oxide synthase by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester results from containing N(G)-Nitro-L-arginine. *Life Sci.* 1997; 60:1803-1809.
39. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide- sensitive guanyl cyclase by 1H-1,2,4oxadiazolo4,3-a-quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* 1995; 48:184-188.
40. Grider JR. Identification of neurotransmitters by selective protection of postjunctional receptors. *Am.J.Physiol.* 1990; 258:G103-G106
41. Grider JR, Murthy KS, Jin JG, Makhlof GM. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *Am.J.Physiol.* 1992; 262:G774-G778
42. Honicka M, Gerzer R. [Soluble guanyl cyclases. Key enzymes for therapeutic applications of the NO principle]. *Internist.Berl.* 1997; 38:427-437.
43. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhury G. Endothelium Derived Relaxing Factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84:9265-9269.
44. Ito S, Sakamoto K, Mochizuki N, Ezashi T, Miwa K, Okuda E, et al. Prostaglandin F2 alpha receptor is coupled to Gq in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1994; 200:756-762.
45. Jahnberg T. Gastric adaptive relaxation. Effects of vagal activation and vagotomy. An experimental study in dogs and in man. *J.Gastroenterol.* 1977; 12:5-32.

46. Jin JG, Murthy KS, Grider JR, Makhlof GM. Activation of distinct cAMP- and cGMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 264:G470-G477
47. Kamata K, Kasuya Y, Kohzuki I. Relaxation response of the rat stomach fundus to methylene blue. *Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1996; 91:205-210.
48. Kamata K, Kohzuki M, Misawa M, Kasuya Y. Involvement of nitric oxide pathway in non- adrenergic non- cholinergic (NANC) relaxation in the rat stomach: differential innervation of NANC nerves in the longitudinal and circular muscle of the fundus. *Gen.Pharmac.* 1993; 24:1403-1410.
49. Kamata K, Sakamoto A, Kasuya Y. Similarities between the relaxations induced by vasoactive intestinal peptide and by stimulation of the non- adrenergic non- cholinergic neurons in the rat stomach. *Nauyn- Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 1988; 338:401-406.
50. Katsoulis S, Clemens A, Schworer H, Creutzfeldt W, Schmidt WE. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a potent relaxant of the rat ileum. *Peptides* 1993; 14:587-592.
51. Koesling D, Bohme E, Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* 1991; 5:2785-2791.
52. Lefebvre RA. Study on the possible neurotransmitter of the non- adrenergic non-cholinergic innervation of the rat gastric fundus. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 1986; 280:110-136.
53. Lefebvre RA. Influence of a selective guanylate cyclase inhibitor, and of the contraction level, on nitrgic relaxation in the gastric fundus. *Br.J.Pharmacol.* 1998; 124:1439-1448.
54. Lefebvre RA, Baert E, Barbier AJ. Influence of NG-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. *Br.J.Pharmacol.* 1992; 106:173-179.
55. Lefebvre RA, Burnstock G. Effect of Adenosine Triphosphate and related Purines in the Rat Gastric Fundus. *Arch.Int.Pharmacodyn.* 1990; 303:199-215.
56. Lefebvre RA, De Beurme FA, Sas S. Effect of Apamin on the response to VIP, ATP and NANC neuronr stimulation in the rat and cat gastric fundus. *J.Auton.Pharmac.* 1991; 11:73-83.
57. Lefebvre RA, Smits GJ, Timmermans JP. Study of NO and VIP as non- adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br.J.Pharmacol.* 1995; 116:2017-2026.

58. Li CG, Rand MJ. Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 1989; 16:933-938.
59. Li CG, Rand MJ. Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non- adrenergic non- cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur.J.Pharmacol.* 1990; 191:303-309.
60. Li W, Stephens NL. Auxotonic loading and airway smooth muscle shortening. *Can.J Physiol.Pharmacol.* 1994; 72:1458-1463.
61. Marczin N, Ryan US, Catravas JD. Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium- derived relaxing factor- induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary artery smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J.Pharmacol. Exp.Ther.* 1992; 263:170-179.
62. Mayer B, Andrew P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition [see comments]. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1998; 358:127-133.
63. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45:367-374.
64. Murthy KS, Makhlouf GM. Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 1995; 268:C171-C180
65. Murthy KS, Zhang KM, Jin JG, Grider JR, Makhlouf GM. VIP-mediated G protein-coupled Ca<sup>2+</sup> influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am.J.Physiol.* 1993; 265:G660-G671
66. Olgart C, Hallen K, Wiklund NP, Iversen HH, Gustafsson LE. Blockade of nitrenergic neuroeffector transmission in guinea-pig colon by a selective inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Acta Physiol.Scand.* 1998; 162:89-95.
67. Piper PJ, Said SI, Vane JR. Effects on smooth muscle preparations of unidentified vasoactiv peptides from intestine and lung. *Nature* 1970; 225:1144-1146.
68. Ramirez MJ, Cenarruzabeitia E, Del Rio J, Lasheras B. Involvement of neurokinins in the non-cholinergic response to activation of 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in guinea-pig ileum. *Br.J.Pharmacol.* 1994; 111:419-424.
69. Rand MJ, Li CG. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu.Rev.Physiol.* 1995; 57:659-682.

70. Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor (serotonin): IV. Isolation and characterisation. *J. Biol. Chem.* 1948; 176:1243-1251.
71. Reeves JJ, Bunce KT, Humphrey PP. Investigation into the 5-hydroxytryptamine receptor mediating smooth muscle relaxation in the rat oesophagus. *Br.J.Pharmacol.* 1991; 103:1067-1072.
72. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996; 111:492-515.
73. Schmidt MJ, Sawyer BD, Truex LL, Marshall WS, Fleisch JH. LY 83583: an agent that lowers intracellular levels of cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate. *J.Pharmacol. Exp.Ther.* 1985; 247:283-288.
74. Schmidt WE, Seebeck J, Hocker M, Schwarzhoff R, Schaefer R, Fornfeldt HM-WC, et al. PACAP and VIP stimulate enzyme secretion in rat pancreatic acini via interaction with VIP/PACAP-2 receptors: Additive augmentation of CCK/Carbachol-induced enzyme release. *Pancreas* 1992; 8:476-487.
75. Schworer H, Katsoulis S, Creutzfeldt W, Schmidt WE. Pituitary adenylate cyclase activating peptide, a novel VIP-like gut-brain peptide, relaxes the guinea-pig taenia caeci via apamin-sensitive potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1992; 346:511-514.
76. Spina D, Ferlenga P, Biasini I, Moriggi E, Marchini F, Semeraro C, et al. The effect duration of selective phosphodiesterase inhibitors in the guinea pig. *Life Sci.* 1998; 62:953-965.
77. Stephens NL, Seow CY, Halayko AJ, Jiang H. The biophysics and biochemistry of smooth muscle contraction. *Can.J. Physiol.Pharmacol.* 1992; 70:515-531.
78. Sundler F, Ekblad E, Absood A, Hakanson R, Koves K, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating peptide: a novel vasoactive intestinal peptide-like neuropeptide in the gut. *Neuroscience* 1992; 46:439-454.
79. Tatemoto K, Mutt V. Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon--secretin family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1981; 78:6603-6607.
80. Taxi J. Cellules de Schwann et "cellules interstitielles de Cajal" au niveau des plexus nerveux de la musculature intestinale du Cobaya: retour aux definitions. *Arch. Anat. Microsc. Morphol.Exp.* 1952; 41:281-304.
81. Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 1982; 71:1-130.



82. Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ. Putative 5-HT<sub>4</sub> receptor involvement in the relaxation induced by 5-HT in the rat ileum. *Br J.Pharmacol.* 1991; 104:151-156.
83. Vane JR. A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. 1957 [classical article]. *Br.J.Pharmacol.* 1957; 120:142-147.
84. Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY, Sanders K.M. Interstitial Cells of Cajal Mediate Enteric Inhibitory Neurotransmission in the Lower Esophageal and Pyloric Sphincters. *Gastroenterology* 1998; 115:314-329.
85. Warshaw DM, Rees DD, Fay FS. Characterization of cross-bridge elasticity and kinetics of cross-bridge cycling during force development in single smooth muscle cells. *J. Gen.Physiol.* 1988; 91:761-779.

## 7. Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

- Abb.1: Schematische Darstellung des verwendeten Versuchsaufbaus mit beteiligten Komponenten. Bei Bestimmung der auxotonischen Kontraktion wurde die angegebene Feder verwendet, bei der isometrischen Kraftaufnahme wurde ohne Feder gearbeitet.
- Abb.2: Basalaktivität eines Muskelstreifen aus dem Magenfundus im 37 °C warmen Organbad, und der Einfluß eines Pufferwechsels (20 °C) auf die Basalaktivität (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).
- Abb.3: Einfluß von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die Basalaktivität eines Muskelstreifens im Zeitverlauf unter Standardbedingungen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe, (Originalaufzeichnung der isometrisch gemessenen Tonusänderungen).
- Abb.4: Einfluß von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die auxotonisch aufgezeichnete Kontraktion. Eines Muskelstreifens im Zeitverlauf (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).
- Abb.5: Einfluß von Serotonin auf die Kontraktionskraft der Muskelstreifen. Die Auxotonisch aufgezeichneten Kontraktionen erreichten nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-5}$  [mol/l]) eine maximale Kontraktion. Nach Zugabe von Serotonin wurde jeweils nach zwei Minuten die Kontraktion bestimmt und auf die maximal mögliche Kontraktion bezogen (n=6).
- Abb.6: Stabilität der Serotonin-induzierten, auxotonisch aufgezeichneten Kontraktion der Muskelstreifen im Zeitverlauf. Die initiale Kontraktion wurde 5 min. nach Serotoninzugabe bestimmt und als Bezugspunkt definiert (n=8).
- Abb.7: Einfluß von elektrischer Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation ) auf den mit Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) prästimulierten Muskelstreifen in Abwesenheit von Atropin und Guanethidin. Der Zeitpunkt der Serotoninzugabe bzw. der Beginn den Elektrischen Feldstimulation (10 sec.) sind mit einem Pfeil markiert (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).

- Abb.8: Einfluß von Atropin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) des Muskelstreifens (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).
- Abb.9: Originalkurve einer Stimulation mit 2 Hz mit den für die Auswertung wichtigen Bezugspunkten. Zur Differenzierung der schnell und verzögert einsetzenden Effekten wurde die Relaxation 20 sec. und 1 min. nach Stimulationsende bestimmt.
- Abb.10: Originalkurve einer Stimulation mit 8 Hz mit den für die Auswertung wichtigen Bezugspunkten. Zur Differenzierung der schnell und verzögert einsetzenden Effekten wurde die Relaxation 20 sec. und 1 min. nach Stimulationsende bestimmt.
- Abb.11: Bild der zeitlich differenzierten Auswertung nach 20 sec. und 1 min. bei der EFS (10 sec. Stimulation). Die EFS induzierte Relaxation ist als % Tonusabfall bezogen auf das Ausgangsplateau nach Serotoninzugabe angegeben (% Inhibition).
- Abb.12: Einfluß von VIP auf den mit Serotonin prästimulierten Muskelstreifen (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Konzentrationsangaben bezeichnen die im Organbad vorhandene VIP Konzentration.
- Abb.13: Einfluß von ANP auf den Serotonin prästimulierten Muskelstreifen (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Konzentrationsangaben bezeichnen die im Organbad vorhandene ANP-Konzentration.
- Abb.14: Einfluß von DEA-NO auf den Serotonin prästimulierten Muskelstreifen (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Konzentrationsangaben bezeichnen die im Organbad vorhandene DEA-NO Konzentration.
- Abb.15: Einfluß von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation ) induzierte Relaxation (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe bzw. den Beginn der elektrischen Feldstimulation.

- Abb.16: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) induzierte Relaxation (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Das System wurde 10 min. mit L-NNA inkubiert.
- Abb.17: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) und L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. (n=10). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.
- Abb.18: Einfluß von Apamin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. (n=12) Apamin wurde 10 min. im System inkubiert.
- Abb.19: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) induzierte Relaxation (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) wurde 10 min. im System inkubiert.
- Abb.20: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. (n=10). ODQ wurde 10 min. im System inkubiert.
- Abb.21: Einfluß von ODQ auf die DEA NO induzierte Relaxation. DEA NO wurde kumulativ zugegeben. Die Relaxation wurde 2 min. nach DEA NO Zugabe bestimmt. ODQ wurde 10 min. im System inkubiert.
- Abb.22: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) und N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA) ( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Zwischen den Relaxationswerten besteht kein signifikanter Unterschied.
- Abb.23: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) und N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA) ( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Zwischen den Relaxationswerten besteht kein signifikanter Unterschied.
- Abb.24: Einfluß von KT 5720 auf die durch elektrische Feldstimulation (40V, 0,5 ms Pulsdauer, 10 sec. Stimulation) induzierte Relaxation bei 8 und 16 Hz (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen).
- Abb.25: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation 1 min. nach Stimulationsende. KT 5720 wurde 15 min. im System inkubiert.

- Abb.26: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation (n=9). KT 5720 wurde 15 min. im System inkubiert.
- Abb.27: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die ANP induzierte Relaxation (n=9). KT 5720 wurde 15 min. im System inkubiert.
- Abb.28: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation bei 2 Hz (Originalaufzeichnung der auxotonisch gemessenen Tonusänderungen). Zaprinast wurde 15 min. im System inkubiert.
- Abb.29: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation (Auswertung nach 1 min.). Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) wurde 15 min. im System inkubiert.
- Abb.30: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) wurde 15 min. im System inkubiert.
- Abb.31: Einfluss von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation. Der Effekt ist statistisch nicht signifikant.
- Abb.32: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation in der Auswertung nach 1 min. Trequinsin wurde 15 min. im System inkubiert (n=9).
- Abb.33: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Trequinsin wurde 15 min. im System inkubiert.
- Abb.34: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation. Trequinsin wurde 15 min. im System inkubiert.
- Abb.35: Übersicht über die von der NO-Synthase (NOS) katalysierten Reaktion mit den daran beteiligten Stoffen. Außerdem dargestellt ist der Einfluß des NO Synthase Inhibitors N $\omega$ -Nitro L-Arginin (L-NNA). Inhibitorischer Einfluß ist durch – gekennzeichnet.
- Abb.36: Übersicht über Wirkungsmechanismen von elektrischer Feldstimulation, VIP und ANP auf die NO Synthase (NOS). Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet.
- Abb.37: Übersicht über den Einfluß bzw. die Wirkung von NO und VIP/ ANP auf die

lösliche Guanylatzyklase (sGC). Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet.

- Abb.38: Übersicht über den Einfluß von VIP/ ANP und KT 5720 auf die Adenylatzyklase (AC) und er von ihr katalysierten Reaktion. Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet, inhibitorischer durch -.
- Abb.39: Übersicht über den Einfluß von Zaprinast auf die Phosphodiesterase V (PDE V) bzw. der von ihr katalysierten Reaktion. sGC steht für lösliche Guanylatzyklase. Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet, inhibitorischer durch -.
- Abb.40: Übersicht über den inhibitorischen Einfluß von Trequinsin bzw. cGMP auf die Phosphodiesterase III (PDE III) bzw. der von ihr katalysierten Reaktion. sGC steht für lösliche Guanylatzyklase. Stimulierender Einfluß ist durch + gekennzeichnet, inhibitorischer durch -.
- 

- Tab.1: Frequenz-Wirkungs-Beziehung bei der EFS. Die 30 sec. bzw. 1 min. nach Stimulationsbeginn gemessenen Werte sind als % Inhibition, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) angegeben.
- Tab.2: Dosis-Wirkungs-Beziehung von VIP. Die 3 min. nach Peptidzugabe gemessenen Werte sind als % Kontraktion, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) bezogen.
- Tab.3: Dosis-Wirkungs-Beziehung von ANP. Die 3 min. nach Peptidzugabe gemessenen Werte sind als % Kontraktion, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) bezogen.
- Tab.4: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DEA-NO. Die 3 min. nach Peptidzugabe gemessenen Werte sind als % Kontraktion, bezogen auf das Ausgangsplateau nach Zugabe von Serotonin ( $10^{-7}$  [mol/l]) bezogen.

- Tab.5: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) und L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.6: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) und L-Arginin ( $3 \times 10^{-3}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.7: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.8: Einfluß von L-NNA ( $10^{-4}$  [mol/l]) auf die ANP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.9: Einfluß von Apamin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.10: Einfluß von Apamin ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.11: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.12: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.

- Tab.13: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation bestimmt 2 min. nach Substanzzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.14: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.15: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die ANP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.16: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 20 sec. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.17: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation und der Auswertung nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.18: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.19: Einfluß von KT 5720 ( $10^{-6}$  [mol/l]) auf die ANP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format



- Tab.20: Einfluß von ODQ ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation in der Auswertung nach 1 min. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.21: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.22: Einfluß von Zaprinast ( $10^{-5}$  [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation bestimmt 2 min. nach Substanzzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.23: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die EFS induzierte Relaxation bestimmt 1 min. nach Stimulationsende. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.24: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die VIP induzierte Relaxation bestimmt 3 min. nach Peptidzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.25: Einfluß von Trequinsin ( $10^{-7}$  [mol/l]) auf die DEA NO induzierte Relaxation bestimmt 2 min. nach Substanzzugabe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt dargestellt, nicht signifikante in normalem Format.
- Tab.26: Übersicht über die von den verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten Methoden.
- Tab.27: Übersicht über die von den verschiedenen Arbeitsgruppen beobachteten Ergebnisse.

## 8. Verzeichniss der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AMP	Adenosin-monophosphat
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-triphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CaCl	Calcium-chlorid
cAMP	Zyklisches Adenosin-monophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosin-monophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlen-dioxyd
DEA NO	Diäthylamid-NO
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EFS	Elektrische Feldstimulation
GTP	Guanosin-triphosphat
Hz	Hertz
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
ICC	Interstitial Cells of Cajal
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
KCl	Kalium-chlorid
KRP	Krebs-Ringer-Puffer
L-Arg	L-Arginin
L-NAME	N $\omega$ -Nitro L-Arginin Methyl-Ester
L-NMMA	N $\omega$ -Monomethyl-L-Arginin
L-NNA	N $\omega$ - Nitro L- Arginin
MgSO <sub>4</sub>	Magnesium-sulphat
min.	Minute(n)
NaCl	Natrium-chlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natrium-hydrogen-phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natrium-hydrogen-carbonat

NANC	Nicht-adrenerg nicht-cholinerg
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxyd)
NOS	NO-Synthase
ODQ	<sup>1</sup> H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one
PDE	Phosphodiesterase
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PHI	Peptid Histidin Isoleucin
sec.	Sekunde(n)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
sGC	Lösliche (soluble) Guanylatzyklase
TTX	Tetrodotoxin
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
5-HT	5 Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)

## **9. Danksagung**

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H.D. Allescher für die Überlassung des bearbeiteten Themas und für die engagierte Betreuung und Führung während der Durchführung und Auswertung der Versuche herzlich danken.

Durch die persönliche Betreuung und die regelmässigen "Journal Club" Veranstaltungen wurde mir der Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht und sehr erleichtert.

Ganz besonders möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. M. Classen und Herrn Prof. Dr. V. Schusdziarra für die freundliche Aufnahme in der II. Medizinischen Klinik der TU München und der Bereitstellung der technischen Möglichkeiten zur Durchführung der Arbeit danken.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Dr. M. Storr als meinem direkten Betreuer für die hilfreiche Unterstützung und Ratgebung bei der Durchführung der Versuche sowie bei deren Auswertung.

Einen besonderer Dank möchte ich Herrn J. Zimmermann aussprechen, dessen äußerst engagierte Unterstützung im Labor mir stets eine große Hilfe war.

Vor allem möchte ich aber meinen Eltern danken, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

**Vielen Dank!**

## 10. Lebenslauf

Persönliche Daten	geboren am 19.11.1972 in München Familienstand: ledig Staatsangehörigkeit: deutsch
Schulbildung	1979 - 83 Torquato-Tasso-Grundschule, München 1983 - 92 Lion Feuchtwanger Gymnasium, München
Studium	1994 - 96 Ludwig-Maximilians-Universität, München 1996 - 2000 Technische Universität, München
Examina	1997 Erstes Staatsexamen 1999 Zweites Staatsexamen 2000 Drittes Staatsexamen
Praktisches Jahr	Innere Medizin: New York Hospital und Memorial Sloan-Kettering Cancer Center of Cornell University, New York, USA Chirurgie: Hospital "La Paz" der Universidad Autonoma, Madrid, Spanien Anästhesie: Klinikum rechts der Isar der TU München
Arzt im Praktikum:	2001 Zentralklinikum Augsburg, I Medizinische Klinik, Kardiologie