

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 )

**Der Einfluß von Adenosinen auf den aszendierenden  
Reflex im Ileum der Ratte**

Dora Triché

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 11.04.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 08.11.2000 angenommen.

## **INHALTSVERZEICHNIS**

	Seite
<b>1.        <u>Einleitung</u></b>	1
<b>2.        <u>Material und Methoden</u></b>	3
2.1.        Versuchsvorbereitung	3
2.1.1.        Puffer	3
2.1.2.        Versuchstiere und Organentnahme	4
2.1.3.        Verwendete Substanzen	4
2.2.        Versuchsdurchführung	6
2.2.1.        Gerätebeschreibung	6
2.2.2.        Versuchsablauf	7

2.3.	Auswertung	8
2.3.1.	Integrierter intraluminaler Druck	8
2.3.2.	Latenz der Erregung	8
2.3.3.	Statistik und Berechnungen	9
<b>3.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>10</b>
3.1.	Charakterisierung des Versuchsaufbaues - das cholinerg- muskarinerge System	10
3.1.1.	Der M <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonist Pirenzepin	10
3.1.2.	Der M <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonist Methoctramin	12
3.1.3.	Der M <sub>3</sub> -Rezeptor-Antagonist Hexahydrosiladifenidol	14
3.2.	Kontrollversuche mit dem Lösungsmittel DMSO	15
3.3.	Apamin, ein Blocker von durch Calcium aktivierten Kaliumkanälen	16
3.4.	Das purinerge System	18
3.4.1.	A <sub>1</sub> -Rezeptor-Agonist- und Antagonist	18
3.4.1.1.	Der A <sub>1</sub> -Agonist N <sup>6</sup> -Cyclopentyladenosin (CPA)	18
3.4.1.2.	Der A <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonist 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropyl- xanthine (DPCPX)	20
3.4.1.3.	Der A <sub>1</sub> -Rezeptor-Agonist N <sup>6</sup> -Cyclopentyladenosin (CPA) in Kombination mit dem A <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonisten 8-Cyclo- pentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX)	23
3.4.1.4.	Der A <sub>1</sub> -Rezeptor-Agonist N <sup>6</sup> -Cyclopentyladenosin (CPA) in Kombination mit dem A <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonisten 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX) und dem	27

	A <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX)	
3.4.2.	A <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonist- und Antagonist	30
3.4.2.1.	Der A <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonist 5'-(N-Cyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA)	30
3.4.2.2.	Der A <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonist 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)	34
3.4.2.3.	Der A <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonist 5'-(NCyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA) in Kombination mit dem A <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonisten 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)	36
3.4.2.4.	Der A <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonist 5'-(NCyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA) in Kombination mit dem A <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX) und dem A <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonisten 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)	39
3.4.2.5.	Der A <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonist 5'-(NCyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA) in Kombination mit Apamin, einem Blocker von durch Calcium aktivierten Kaliumkanälen	41
3.4.3.	Die Wirkung von endogenem und exogen zugeführtem ATP	43
3.4.3.1.	α,β-Methyladenosine-5'-Triphosphat, ein substituiertes ATP und Apamin	43
3.4.3.2.	Der P <sub>2y</sub> -Rezeptor-Antagonist reactive blue 2	46
<b>4.</b>	<b><u>Allgemeine Diskussion</u></b>	<b>49</b>
4.1.	Untersuchungsobjekt Ileum	49
4.1.1.	Anatomie des Ileum	50
4.1.2.	Das extrinsische Nervensystem	
4.1.2.1.	Der Parasympatikus	51
4.1.2.2.	Der Sympatikus	51
4.1.3.	Das enterische Nervensystem	52
4.1.3.1 .	Der "migrierende Motorkomplex"	54
4.1.3.2 .	Interstitial cells of Cajal	54

4.1.3.3.	Transmittersubstanzen des enterischen Nervensystems	56
4.2.	Der peristaltische Reflex	60
4.2.1.	Der die Muskelkontraktion auslösende Reiz und die notwendigen Rezeptoren	60
4.2.2.	Rolle der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur im Rahmen der Muskelkontraktion	61
4.2.3.	Die inhibierende Komponente des peristaltischen Reflexes	63
4.3.	Purine	
4.3.1.	Historischer Rahmen	
4.3.2.	Purinerge Überträgerstoffe, ihre Synthese, Speicherung und Freisetzung	65
4.3.2.1.	ATP als Neurotransmitter	65
4.3.2.2.	Adenosine im Gastrointestinaltrakt	68
4.3.2.2.1.	Die Purinrezeptoren	68
4.3.2.2.1.1.	Einteilungskriterien	69
4.3.2.2.1.2	P <sub>1</sub> -Rezeptoren	71
4.3.2.2.1.2.1.	A <sub>1</sub> -Rezeptoren	72
4.3.2.2.1.2.2.	A <sub>2A</sub> -Rezeptoren	73
4.3.2.2.1.2.3.	A <sub>2B</sub> -Rezeptoren	75
4.3.2.2.1.2.4.	A <sub>3</sub> -Rezeptoren	76
4.3.2.2.1.3.	P <sub>2</sub> -Rezeptoren	77
4.3.2.2.1.4.	Verteilung der Purinrezeptoren	
4.3.2.2.1.5.	Molekularer Aufbau der Purinrezeptoren und die daraus abgeleitete Wirkungsweise	85
4.3.2.3.	Neue Purinantagonisten	88
4.3.3.	Therapeutische Verwendung der Adenosine	90
<b>5.</b>	<b><u>Spezielle Diskussion</u></b>	<b>93</b>
5.1.	Entwicklung der Erforschung des peristaltischen Reflexes und Merkmale des Reflexmodells	93

5.2.	Physiologische Vorgänge während des Ablaufes des exzitatorischen ascendierenden Reflexes nach Stimulation	96
5.2.1.	Der zeitliche Ablauf der Kontraktion des Ileumsegmentes	96
5.2.2.	Biochemische und neurophysiologische Vorgänge während des peristaltischen Reflexes	97
5.2.3.	Die Latenzzeit bis zur Auslösung des peristaltischen Reflexes bei elektrischer Feldstimulation	100
5.2.4.	Diskussion auffälliger Befunde bei der Auslösung des peristaltischen Reflexes	101
5.3.	Der Einfluß der untersuchten Substanzen auf den aufsteigenden, exzitatorischen Reflex	103
5.3.1.	Apamin	103
5.3.2.	Pirenzepin	105
5.3.3.	Methoctramin	
5.3.4.	Hexahydrosiladifenidol	
5.3.5.	A <sub>1</sub> -Agonist- und Antagonist und A <sub>2</sub> -Agonist- und Antagonist	107
5.3.5.1.	N <sub>6</sub> -Cyclopentyladenosin (CPA)	108
5.3.5.2.	8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX)	108
5.3.5.3.	5'-(N-Cyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA)	111
5.3.5.4.	3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)	112
5.3.6.3.	A <sub>2A</sub> -Rezeptor-Antagonist	114
5.3.7.	A <sub>3</sub> -Adenosin-Rezeptor-Antagonisten	115
5.3.8.	alpha-beta-methylen-ATP	116
5.3.9.	reactive blue 2	118
6.	<b><u>Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse</u></b>	119
7.	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	121
8.	<b><u>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</u></b>	141

9.	<u>Danksagung</u>	147
10.	<u>Lebenslauf</u>	148

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
cm	Zentimeter
EJP	exzitatorische Junctionspotentiale
ENS	enterisches Nervensystem
g	Gramm
GRP	Gastrin-releasing-peptide
Hz	Hertz
IJP	inhibitorische Junctionspotentiale
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunde
NANC	nicht-adrenerg-nicht-cholinerg

NO	Stickoxyd
PP	Pancreatic polypeptide
S.	Seite
sog.	sogenannte(-r)
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
V	Volt
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Neben den bekannten Überträgersubstanzen Acetylcholin und Noradrenalin kennt man schon seit einiger Zeit eine ganze Reihe weiterer Transmitter des autonomen Nervensystems. Die Forschung auf diesem Gebiet zeigt stets neue Substanzen- und Substanzgruppen auf, die eine wichtige Rolle als Regulatoren im Bereich des autonomen Nervensystems spielen.

Das Nervensystem des Gastrointestinaltraktes stellt ein in sich geschlossenes funktionelles System dar, das über funktionelle Regelkreise und Reflexwege verfügt. Der sicherlich bekannteste Reflex ist der myenterische Reflex oder auch peristaltische Reflex, der bereits zur Jahrtausendwende erstmals beschrieben wurde (Bayliss et al, 1899, S.98) und durch folgende Arbeiten weiter charakterisiert wurde (Trendelenburg et al, 1917, S.60), (Bülbring et al, 1958, S.442) , (Kosterlitz et al, 1956, S.680), (Costa et al, 1987, S.10). Bereits in den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts wurde auf dem Gebiet der Purine geforscht (Drury et al, 1929, S.213). Schon früh erkannte man die überragende Bedeutung dieser Substanzgruppe, die im Mittelpunkt der folgenden Arbeit steht. Jedoch dauerte es einige Zeit, bis auch im Gastrointestinaltrakt die ersten Versuche stattfanden. Die Entdeckung der nicht-adrenergen-nicht-cholinergen (NANC)-Transmission im autonomen

Nervensystem führte zu der Annahme, daß Purinen eine mögliche Rolle als Überträgersubstanzen im enterischen Nervensystem zukommen könnte. Dies wurde dann erstmals von der Arbeitsgruppe um Burnstock durch funktionelle Arbeiten an der Gefäßinnervation des Magen-Darm-Traktes postuliert (Burnstock, 1969, S.247). Zwar wurde bisher eine funktionelle Rolle von Adenosinen im enterischen Nervensystem postuliert, die Rolle der Adenosine in diesem Reflexsystem sind bisher aber nicht untersucht oder charakterisiert worden (Burnstock et al, 1969, S.247).

Die Schwierigkeit der Suche nach spezifischen Antagonisten für die Adenosinerezeptoren führt dazu, daß die Wirkungsweise der Adenosine auf die verschiedenen Adenosinrezeptoren erst allmählich entdeckt wird. Diese noch unvollendete Entwicklung der Erforschung der Adenosine spiegelt sich in der Tatsache wieder, daß die Nomenklatur erst kürzlich erneuert und aktualisiert wurde (Fredholm et al, 1994, S.150) und zudem stets neue Adenosinrezeptoren entdeckt werden (Palmer et al, 1994, S.85).

Bei dem für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendeten System handelt es sich um ein Modell, an dem der aufsteigende peristaltische Reflex *in vitro* nachgeahmt werden kann. Es ist eine Abwandlung des bereits von Trendelenburg verwendeten Organmodells (Trendelenburg et al, 1917, S.61). Diese Apparatur bietet einige bedeutende Vorteile: es besteht die Möglichkeit, die neurale Innervation ziemlich physiologisch durch eine elektrische Stimulation zu ersetzen. Durch eine Stimulation am analen Ende des Darmsegmentes kann der hier interessierende aufsteigende exzitatorische Reflex ausgelöst werden. Die Kontraktion des Ileumsegmentes und jegliche, sei es auch nur sehr geringfügige Änderung der Kontraktionsstärke kann durch eine intraluminal eingebrachte Druckmeßsonde erfaßt werden. Die Vermessung der Kontraktionskraft kann auf einfache Weise an Hand der Ausmessung der Fläche unter einer durch einen Schreiber aufgezeichneten Kurve erfolgen. Dieses System erwies sich bereits mehrfach als sehr brauchbar für die Beurteilung der Wirkung verschiedener Substanzen auf den aufsteigenden Reflex im Ileum der Ratte, und soll auch in dieser Arbeit Verwendung finden.

Ziel dieser Arbeit ist es die Rolle von Purinen auf den aszendierenden myenterischen Reflex im Ileum der Ratte *in vitro* zu untersuchen.

Insbesondere sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluß haben  $P_1$ -Rezeptoren? Dies kann durch die Zugabe von selektiven  $A_1$ - und  $A_2$ -Agonisten untersucht werden?
- Welchen Einfluß haben endogene Adenosine? Hierzu werden spezifische  $A_1$ - und  $A_2$ -Antagonisten verwendet?

- Kann die  $A_1$ -Agonist-Wirkung durch den  $A_1$ -Rezeptor-Antagonisten bzw. die  $A_2$ -Agonist-Wirkung durch den  $A_2$ -Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden, d.h. sind die Wirkungen reversibel?
- Wie verhält es sich mit der Antagonisierbarkeit der erzielten Wirkungen durch den Antagonisten des anderen Rezeptors, d.h. sind die Wirkungen spezifisch?
- Welchen Einfluß hat ATP auf den ascendierenden myenterischen Reflex?
- Wie entstehen Eigenkontraktionen des Ileum und wie sind sie beeinflussbar?

In einem ersten Teil soll das Reflexmodell zunächst in ihrer Anwendbarkeit mit Hilfe der muskarinergen Neurotransmitter Methoctramin, Pirenzepin, Hexahydro-sila-difenidol und von Apamin überprüft werden.

Dann werden Untersuchungen mit verschiedenen Kombinationen der purinergen Substanzen durchgeführt, um eine genaue Differenzierung der unterschiedlichen Adenosinrezeptoren erzielen zu können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchsvorbereitung**

#### **2.1.1. Puffer**

Für die Versuche wurde ein Krebs-Henseleit-Puffer verwendet. Dieser Puffer wurde folgendermaßen hergestellt: zu einem Liter destilliertem Wasser wurden unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer 6,75 g Natriumchlorid, 1,86 g Natriumhydrogencarbonat und 2,0 g Glukose zugegeben. Anschließend wurde die Lösung mit Carbogen, d.h. einem Gasgemisch, das zu 95%

Sauerstoff und zu 5% Kohlendioxyd enthält, begast. Die Begasung ist notwendig, um ein Ausfallen von Kalziumchlorid aus der Lösung zu verhindern. Nun wurden der Lösung jeweils 10 ml der Stammlösung 1, 2, 3 und 4 hinzugefügt.

Stammlösung 1: 3,43% KCl

Stammlösung 2: 2,86% MgSO<sub>4</sub>

Stammlösung 3: 1,60% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Stammlösung 4: 3,68 CaCl<sub>2</sub>

Der oben beschriebene Puffer wird einerseits verwendet, um den Darm bis zum Versuchsbeginn aufzubewahren, andererseits wird der Glasbehälter, in dem die Versuche stattfinden, mit ihm gefüllt.

### **2.1.2. Versuchstiere und Organentnahme**

Für die Versuche wurden Wisterratten verwendet (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld), die männlich und 250 - 350g schwer waren. Die Tiere wurden in einem vollklimatisierten Raum gehalten, und erhielten bis 48 Stunden vor Versuchsbeginn Trockenfutter und Wasser, ab diesem Zeitpunkt nur noch Wasser.

Die Narkose zur Organentnahme bestand aus einer 15-sekündigen Betäubung mit CO<sub>2</sub>-Gas, und einer anschließenden intraperitonealen Injektion von Pentobarbital-Natrium (Narcoren, Rhone-Merieux GmbH, Laupheim) in einer Dosierung von 80 mg / kg Körpergewicht. Die Spontanatmung der Ratten blieb während der Betäubung erhalten.

Zur Organentnahme wurden die Versuchstiere auf einer festen Unterlage fixiert, und das Abdomen durch einen Schnitt entlang der linea alba eröffnet. Nach Aufsuchen des ileocecalen Überganges wurde ein etwa 10 cm langer, stuhlfreier Abschnitt des terminalen Ileum durch Durchtrennung der Mesenterialwurzel entnommen, und sofort in eine Schale mit begastem Krebs-Ringer-Puffer gegeben. Die gesamte Operation nahm ca. 3-5 Minuten in Anspruch, die Ischämiezeit von der Abtrennung von der Blutversorgung bis zum Einbringen in den Puffer betrug maximal 30 Sekunden.

### 2.1.3. Verwendete Substanzen

Die hier aufgelisteten Substanzen wurden für die Versuche benutzt:

- Apamin ( Sigma, ST. Louis, USA 9 )
- Hexahydro-Sila-Difenidol-HCl ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )
- Methoctramin ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )
- Pirenzepin ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )
- N-Cyclopentyladenosine = CPA ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )
- 8-Cyclopentyl-3,7-dihydro-1,3-dipropyl-1H-purine-2,6-dione = DPCPX ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )
- 1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-N-cyclopropyl-1-deoxy-β-D-ribofuranuronamide = CPCA ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )
- 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine = DMPX ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )
- Alpha,β-Methyladenosine 5'-Triphosphosphate, Lithiumsalz (Sigma, St. Louis USA)
- 1-Amino-4-{{4-{{4-chloro-6-((3(oder 4)-sulfophenyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)-3-sulfophenyl)amino)-9-10-dioxo-2-anthracenesulfonic acid = reactive blue ( RBI, Research Biochemicals Incorporated, Massachusetts )

Zudem wurden Versuche mit dem Lösungsmittel DMSO in steigender Konzentration durchgeführt, um eine Verfälschung der durch die Versuchssubstanzen erzielten Ergebnisse auszuschließen.

Bei den mit dem A<sub>2</sub>-Rezeptor DPCPX durchgeführten Versuchen fiel eine besonders große Zahl von Eigenkontraktionen auf. Um die Abhängigkeit der Eigenkontraktionen von der Zugabe von DPCPX zu überprüfen, wurden in einer Versuchsreihe die Anzahl der Eigenkontraktion pro Minute ohne und mit DPCPX ausgezählt. Diese Versuche wurden unter den selben Versuchsbedingungen

durchgeführt wie die Stimulationsversuche, mit der einzigen Abweichung, daß diesmal nicht elektrisch stimuliert wurde.

## **2.2. Versuchsdurchführung**

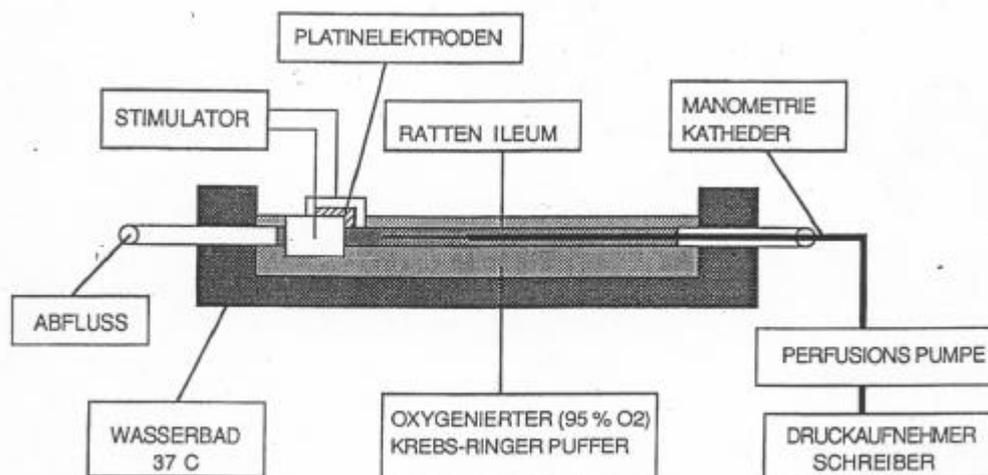
### **2.2.1. Gerätebeschreibung**

Für die Versuche wurde eine Abwandlung der bereits von Trendelenburg (Trendelenburg et al, 1917, S.55) entwickelten und angewendeten Methode, mit der sich die Darmperistaltik quantitativ bestimmen läßt, benutzt.

Der Versuchsaufbau beinhaltet ein Organbad (siehe Abbildung), das zunächst aus einer quadratischen Glasschale mit einer Seitenlänge von 11 cm und einer Höhe von 3,5 cm besteht. Die Wände der Wanne bilden ein Hohlsystem, in dem während der Versuche über ein Pumpsystem angetrieben auf 37°C aufgeheiztes Wasser zirkuliert. An den beiden Enden des Bades befindet sich je ein auf halber Höhe angebrachtes, etwa 4 cm langes, etwa 1,5 cm in den Wanninnenraum reichendes Plastikschläuchchen. Diese dienen als Befestigungslager für das Darmsegment, das beidseits über die Schläuche gezogen und mit kleinen Kanülen befestigt wurde. An der aboralen Seite konnte der während des Versuchs entstandene Schleim durch den Schlauch abfließen und von der oralen Seite her wurde ein perfundierter Manometrieschlauch in das Darmsegment vorgeschoben. Diese Drucksonde besteht aus einem zweilumigen Katheter, der mit einer Perfusionspumpe (Mui Scientific, Missisauga, Canada) über einen Druckaufnehmer (Peter van Berg, Deutschland) perfundiert wird. Der Druckaufnehmer wurde über eine entsprechende Meßbrücke an einen Polygraphen (R 611; Sensormedics, Anaheim, California, USA) angeschlossen, sodaß so die Aufzeichnung des Druckes nach Verstärkung erfolgen konnte. Der Dynograph Recorder zeichnete die Druckverläufe an beiden Meßpunkten und die elektrische Stimulation synchron auf.

Der Manometer wurde so in den Darm eingebracht, daß die beiden Öffnungen an denen der Druck gemessen wurde, 2 cm und 4 cm oral des Stimulationsortes lagen. Auf diese Weise wurden die Druckänderung genau definiert 2cm und 4cm oral des Stimulationsortes registriert.

Die elektrische Feldstimulation wurde periodisch alle 2 Minuten über eine Dauer von 20 Sekunden mit einem Stimulationsgerät (Grass S 11 Stimulator, Grass Medical Instrument, Quincy, Mass., USA) mit folgenden Stimulationsparametern durchgeführt: 3 Impulse/s, Dauer des Stimulationsreizes 1ms, Stimulationsstärke 20V.



**Abbildung 1:**  
Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues

### 2.2.2. Versuchsablauf

Zunächst wurde wie oben berichtet das Ileumsegment der Ratte entnommen und für den Versuch präpariert. Dann wurde das Präparat in die Wanne eingelegt, die beiden Enden vorsichtig über die Plastikschläuche gezogen und mit kleinen Kanülen fixiert. Jetzt wurde die Wanne mit 20ml Krebs-Ringer-Puffer gefüllt, sodaß der Darm komplett von Puffer bedeckt war. Der nächste Schritt bestand darin, die Druckmeßsonde in das Darmsegment einzuführen. Nun wurde das System 10 Minuten equilibriert, bevor die erste Stimulation erfolgte. Die Stimulation bestand aus einem intermittierenden

elektrischen Reiz von 20 Sekunden Länge mit einer nachfolgenden Pause von 1 Minute und 40 Sekunden. Zunächst wurde periodisch stimuliert, bis die Antwort auf den Stimulationsreiz konstant war. Nun wurden die verschiedenen Substanzen in aufsteigender Konzentration bzw. Krebs-Ringer-Puffer oder 0,9%-ige Natrium-Chloridlösung als Kontrolle zugegeben, und bei jeder Konzentration dreimal stimuliert.

## **2.3. Auswertung**

### **2.3.1. Integrierter intraluminaler Druck**

Um eine Aussage über die Kontraktionsstärke machen zu können, wurden mit Hilfe eines Digitalisierensbrettes durch manuelles Nachfahren der Kurven die Flächen unter den Kurven bestimmt. Die Messung erfolgte ab dem Stimulationsbeginn über ein Zeitintervall von 30 s. Die Meßstrecke 30s wurde so gewählt, daß alle durch die Stimulation hervorgerufenen Druckänderungen erfaßt wurden.

### **2.3.2. Latenz der Erregung**

Parallel zum Druckverlauf wurden die elektrischen Impulssignale auf dem Schreiber aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Latenz wurde das Zeitintervall zwischen dem ersten Impuls (Stimulationsbeginn) und dem halbmaximalen Druckanstieg ermittelt.

### **2.3.3. Statistik und Berechnungen**

Zunächst wurde aus den berechneten Daten für Fläche, Amplitude und Latenz pro Konzentration der zugegebenen Substanz jeweils getrennt für die beiden Meßorte der Mittelwert bestimmt. Dann wurde die relative Kontraktionsstärke, bezogen auf den Ausgangswert noch ohne Substanzzugabe, ermittelt.

Die Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. "n" steht für die Anzahl an voneinander unabhängigen Versuchen mit Ileumsegmenten aus jeweils unterschiedlichen Versuchstieren.

Die Signifikanzanalyse erfolgte mit Hilfe von Varianzanalyse bzw. Student-t-Test für gepaarte Daten gefolgt von einem post-hoc-Test als Dunnett-Test oder Tukey's-Test für mehrfachen Vergleich. Als signifikant wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  anerkannt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Charakterisierung des Versuchsaufbaues - das cholinerg-muskarinerge System**

In der ersten Vergleichsserie sollte zunächst das cholinerg-muskarinerge System als entscheidender Mediator für den ascendierenden Reflexweg charakterisiert werden.

### 3.1.1. Der M<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist Pirenzepin

Nach Zugabe des M<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Pirenzepin zwischen den periodisch erfolgenden Stimulationen konnte an beiden Meßpunkten (2cm und 4cm oral des Stimulatonsortes) eine Abnahme der Kontraktionsstärke vermerkt werden, die bei einer Konzentration von 10<sup>-10</sup>M auf 48,2% (bei 4cm) bzw. 49,7% (bei 2cm) des Ausgangswertes betrug. Bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M konnte sogar eine Reduktion bis auf 5,0 % (bei 4cm) bzw. 3,9 % (bei 2cm) des Kontrollwertes erzielt werden (Tab. 1).

Es wurde insgesamt die Wirkung von Pirenzepin in den Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> M bis 3\*10<sup>-4</sup> M in zunehmender Konzentration getestet, wobei die Abnahme der Kontraktionsstärke mit zunehmender Konzentration deutlicher wurde (n = 11).

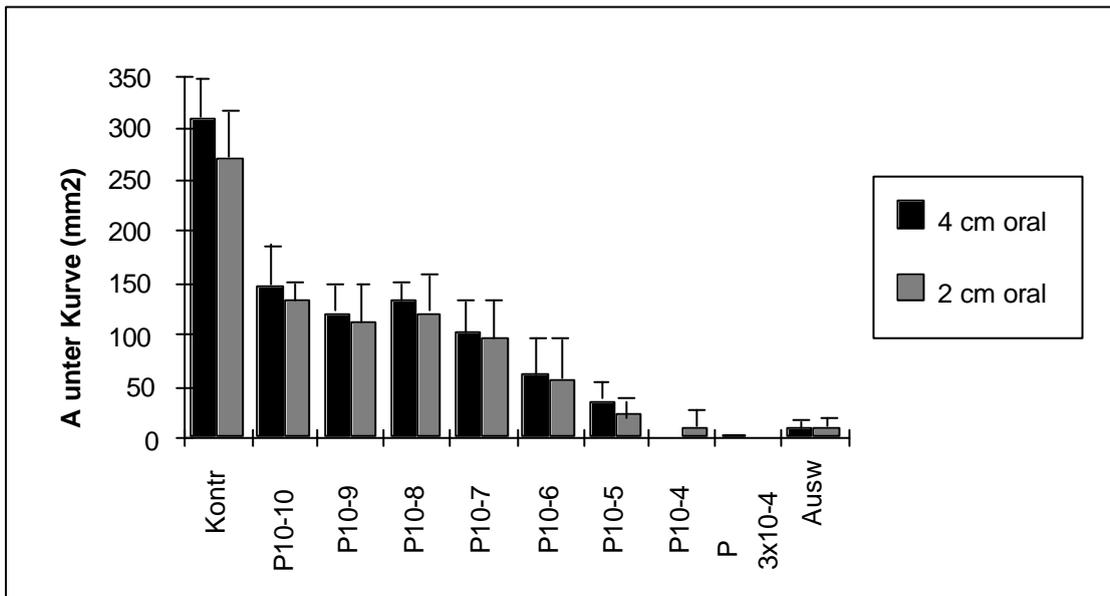
Die inhibitorische Wirkung von Pirenzepin war nur teilreversibel, d.h. selbst nach mehrmaliger intensiver Spülung mit Puffer konnte die Kontraktionsstärke, die zu Beginn des Versuchs bestand, nicht mehr erreicht werden. Es zeigte sich lediglich eine Erhöhung auf 4,0-4,6 % des Basalwertes.

Tabelle 1:

Intraluminaler Druck (Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Pirenzepin (M) (n = 11)

	2cm oral	%	4cm oral	%
Kontrolle	270,6±55,0	100,0	307,6±53,8	100,0

$10^{-10}$	134,4±22,8	49,7	148,4±24,1	48,2
$10^{-9}$	112,6±21,3	41,6	120,7±22,7	39,2
$10^{-8}$	122,4±44,9	45,2	134,4±47,9	43,7
$10^{-7}$	97,6±23,8	36,1	102,6±31,7	33,4
$10^{-6}$	56,5±19,5	20,9	61,4±21,2	20,0
$10^{-5}$	24,4±8,8	9,0	37,0±12,2	12,0
$10^{-4}$	10,5±5,5	3,9	15,4±7,1	5,0
$3 \cdot 10^{-4}$	0,7±0,8	0,3	1,9±2,0	0,6
Auswaschen	12,4±5,1	4,6	12,4±5,4	4,0



### Abbildung 2:

Graphische Darstellung des Einflusses von Pirenzepin ( $10^{-10}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M und  $3 \cdot 10^{-4}$ M) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

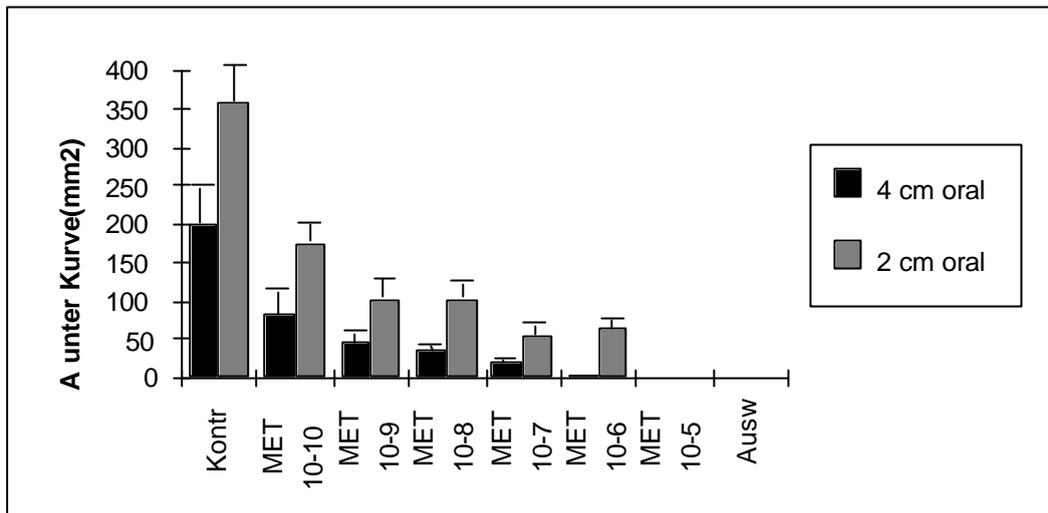
### 3.1.2. Der M<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist Methoctramin

Methoctramin bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Kontraktionsstärke. Bei einer Konzentration von 10<sup>-9</sup>M betrug die Fläche unter der Kurve nur noch 27,1% (bei 2cm) bzw. 38,3% (bei 4cm) des Kontroll-Wertes. Bei der Konzentration 10<sup>-6</sup>M waren es sogar nur noch 0,6% (bei 2cm) bzw. 1,6% (bei 4cm) der Ursprungsfläche (n = 9).

Tabelle 2:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Methoctramin (M) (n = 9)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	359,3±105,1	100,0	199,2±55,0	100,0
10 <sup>-10</sup> M	177,2±53,9	49,3	81,0±17,7	40,7
10 <sup>-9</sup> M	102,7±30,5	28,6	47,1±15,6	23,6
10 <sup>-8</sup> M	103,0±33,6	28,7	39,0±17,0	19,6
10 <sup>-7</sup> M	54,6±13,4	15,2	22,1±7,3	11,1
10 <sup>-6</sup> M	5,9±2,5	1,6	1,8±0,9	0,9
10 <sup>-5</sup> M	0,6±0,7	0,2	0,0±0,0	0,0
nach Ausw.	0,0±0,0	0,0	0,0±0,0	0,0



**Abbildung 3:**

Graphische Darstellung des Einflusses von Methoctramin ( $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  und  $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

### 3.1.3. Der $M_3$ -Rezeptor-Antagonist Hexahydrosiladifenidol

Die Applikation von Hexahydrosiladifenidol in steigender Konzentration (signifikant ab  $10^{-10}\text{M}$ ) bewirkte eine starke Abnahme der aufgezeichneten Stimulationsantwort. Nach Auswaschen mit Puffer konnte die Wirkung von Hexahydrosiladifenidol wieder teilweise, wenn auch nicht komplett, rückgängig gemacht werden.

Tabelle 3:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Hexahydrosiladifenidol (M) (n = 15)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	156,7±40,4	100,0	84,9±18,6	100,0
+Hexa-Hydro				
10 <sup>-10</sup>	74,1±17,0	47,3	42,6±9,0	50,2
10 <sup>-8</sup>	64,3±19,8	41,0	39,9±14,7	47,1
10 <sup>-7</sup>	33,3±8,9	21,3	16,8±4,8	19,8
10 <sup>-6</sup>	18,1±7,1	11,6	9,7±3,9	11,4
10 <sup>-5</sup>	1,0±0,9	0,7	0,6±0,5	0,7
Ausw.	53,2±31,1	34,0	29,4±16,9	34,6

### 3.2. Kontrollversuche mit dem Lösungsmittel DMSO

Da DPCPX, eine der in den Versuchen verwendeten Substanzen, kaum wasserlöslich war und daher in dem Lösungsmittel DMSO zunächst aufgelöst und dann im Rahmen von

Verdünnungsreihen weiterverdünnt wurde, wurden entsprechende Kontrollversuche mit dem Lösungsmittel DMSO alleine durchgeführt.

Es wurde hierbei eine den mit Wirksubstanzen gemachten Versuchen entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt, wobei jedoch als zugegebene Lösung verdünntes DMSO verwendet wurde. Ziel dieser Variante war es zu sehen, ob die starke Inhibition mit DPCPX nicht eine Wirkung des Lösungsmittels sein könnte.

Sowohl beim Meßpunkt bei 2cm wie auch beim Meßpunkt bei 4cm blieb die Reflexantwort konstant oder nahm sogar nach Zugabe von DMSO etwas zu. Daraus läßt sich ableiten, daß die in den Hauptversuchen erzielten Ergebnisse mit DPCPX eine Wirkung der Substanz selbst waren.

Tabelle 4:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) bei einer Verdünnungsreihe mit DMSO (n = 11)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	266,8	100,0	246,3	100,0
10 <sup>-9</sup>	234,2	87,8	234,2	95,1
10 <sup>-8</sup>	308,4	115,6	219,2	88,9
10 <sup>-7</sup>	286,9	107,5	291,1	118,2
10 <sup>-6</sup>	297,4	111,5	291,2	118,4
10 <sup>-5</sup>	290,8	109,0	251,0	101,9
Auswaschen	164,5	61,7	123,3	50,1

### 3.3. Apamin, ein Blocker von durch Calcium aktivierten Kaliumkanälen

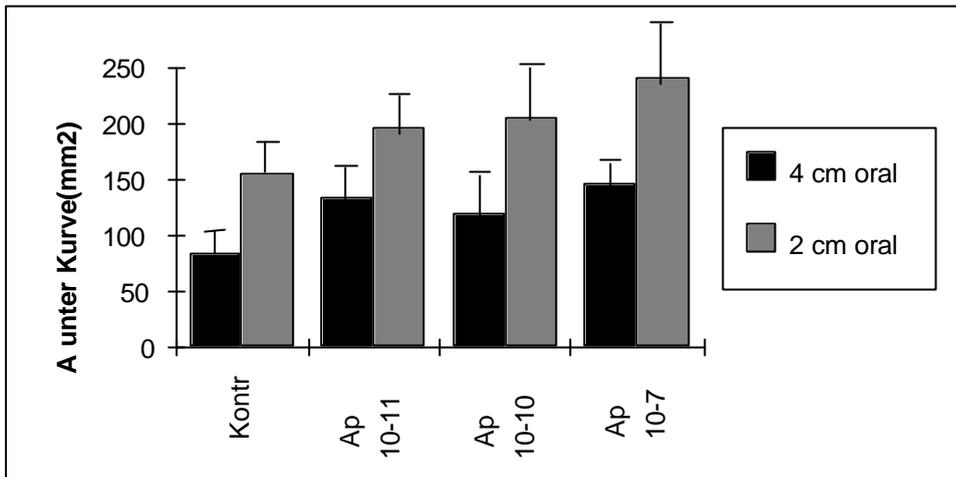
Die Versuche mit Apamin, einem Blocker von durch Calcium aktivierten Kaliumkanälen, wurden durchgeführt als Vorbereitung von Kombinationsversuchen mit dem A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten 5'-(NCyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA) und α,β-Methyladenosine-5'-Triphosphat. Es sollte zunächst die Wirkung der primär in das Organbad zugegebenen Substanz Apamin demonstriert werden.

Die Zugabe von Apamin in das Organbad in steigender Konzentration von 10<sup>-11</sup> M bis 10<sup>-7</sup> M hat eine signifikante Steigerung der Kontraktionsstärke ab einer Konzentration von 10<sup>-11</sup>M bewirkt.

Tabelle 5:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrischen Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Apamin (M) (n = 15)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	156,7±40,4	100,0	84,9±18,6	100,0
Apamin				
10 <sup>-11</sup>	194,9±59,0	124,4	134,9±34,9	158,9
10 <sup>-10</sup>	206,1±50,0	131,5	120,0±28,8	141,3
10 <sup>-7</sup>	241,3±100,0	154,0	145,7±49,8	171,6



**Abbildung 4:**

Graphische Darstellung des Einflusses von Apamin ( $10^{-11}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$  und  $10^{-7}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

### 3.4. Das purinerge System

#### 3.4.1. $A_1$ -Rezeptor-Agonist- und Antagonist

##### 3.4.1.1. Der $A_1$ -Agonist $N_6$ -Cyclopentyladenosin (CPA)

$N_6$ -Cyclopentyladenosin (CPA) wurde in den Konzentrationen  $10^{-14}\text{ M}$  bis  $10^{-8}\text{ M}$  in das Organbad gegeben, und sein Einfluß auf die Reflexantwort untersucht. Hierbei zeigte sich

lediglich eine trendmäßige, konzentrationsabhängige Steigerung der Kontraktionsstärke um 163,2 % (bei 4cm) bzw. 135,9 % (bei 2cm) bei der Konzentration  $10^{-8}$  M mit einem p-Wert von 0,06. Nach Auswaschen der Substanz mit begaster Pufferlösung konnte ein Abfall der Kontraktionsstärke auf nahezu Ausgangsniveau verzeichnet werden.

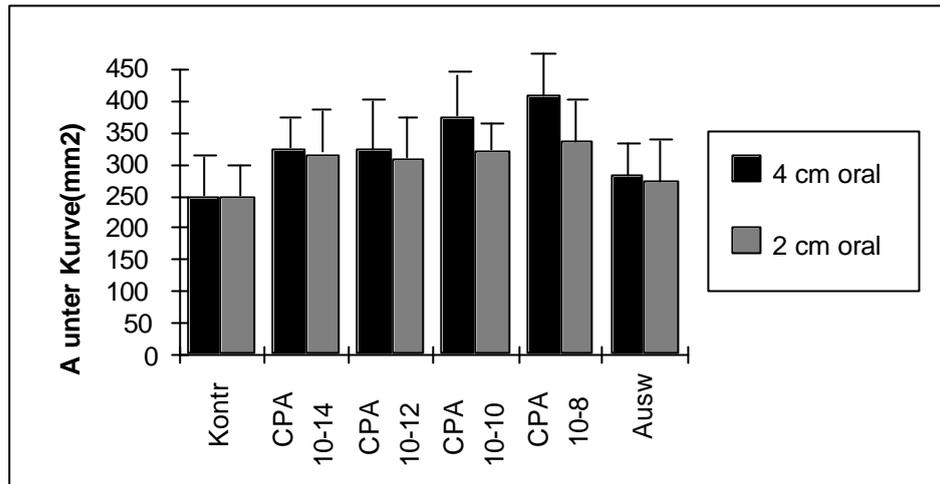
Tabelle 6:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von N6-Cyclopentyladenosin (M) (n = 12)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	246,8±52,6	100,0	248,8±45,3	100,0
$10^{-14}$	315,3±53,3	127,8	325,4±55,9	130,8
$10^{-12}$	308,3±57,8	124,9	353,9±55,1*	130,2
$10^{-10}$	319,1±57,3	129,3	374,6±66,2*	150,6
$10^{-8}$	335,4±75,1	135,9	406,0±80,0*	163,2
Auswaschen	273,0±75,3	110,6	280,0±64,3	112,5

nicht signifikant

Varianzanalyse  
 $F=4,3$ ,  $p<0,006$   
 \*:signifikant ( $p<0,05$  im Dunnett-Test)  
 unterschiedlich im Vgl. zur Kontrolle



**Abbildung 5:**

Graphische Darstellung des Einflusses von CPA ( $10^{-14}$ M,  $10^{-12}$ M,  $10^{-10}$ M und  $10^{-8}$ M) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

### 3.4.1.2. Der $A_1$ -Rezeptor-Antagonist 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX)

Bei 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX), das mit voller chemischer Bezeichnung 8-Cyclopentyl-3,7-dihydro-1,3-dipropyl-1H-purine-2,6-dione heißt, handelt es sich um einen selektiven Antagonisten von  $A_1$ -Rezeptoren.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurden folgende Ergebnisse mit DPCPX erzielt: es zeigte sich eine deutliche, konzentrationsabhängige Reduktion der Kontraktionsantwort in den verwendeten Konzentrationen von  $10^{-9}$ M bis  $10^{-5}$ M. Die Ergebnisse sind signifikant mit einem p-Wert von  $<0,001$  (bei  $10^{-5}$ M). Der Effekt von DPCPX war durch Auswaschen zum Teil reversibel und die Reflexantwort erreichte wieder 61,1 % (bei 2cm) bzw. 56,5 % (bei 4cm) des Ausgangswertes.

Auffallend war eine hohe Zahl an Eigenkontraktionen, die nach Zugabe von DPCPX in das Organbad auftraten. Hierbei handelt es sich um Kontraktionen, die sich ohne vorherige

elektrische Stimulation ereignen. Dies könnte darauf hindeuten, daß trotz der hemmenden Wirkung von DPCPX auf den ascendierenden Reflex  $A_1$ -Rezeptoren normalerweise die Auslösung von Spontankontraktionen und Spontanaktivität unterdrücken.

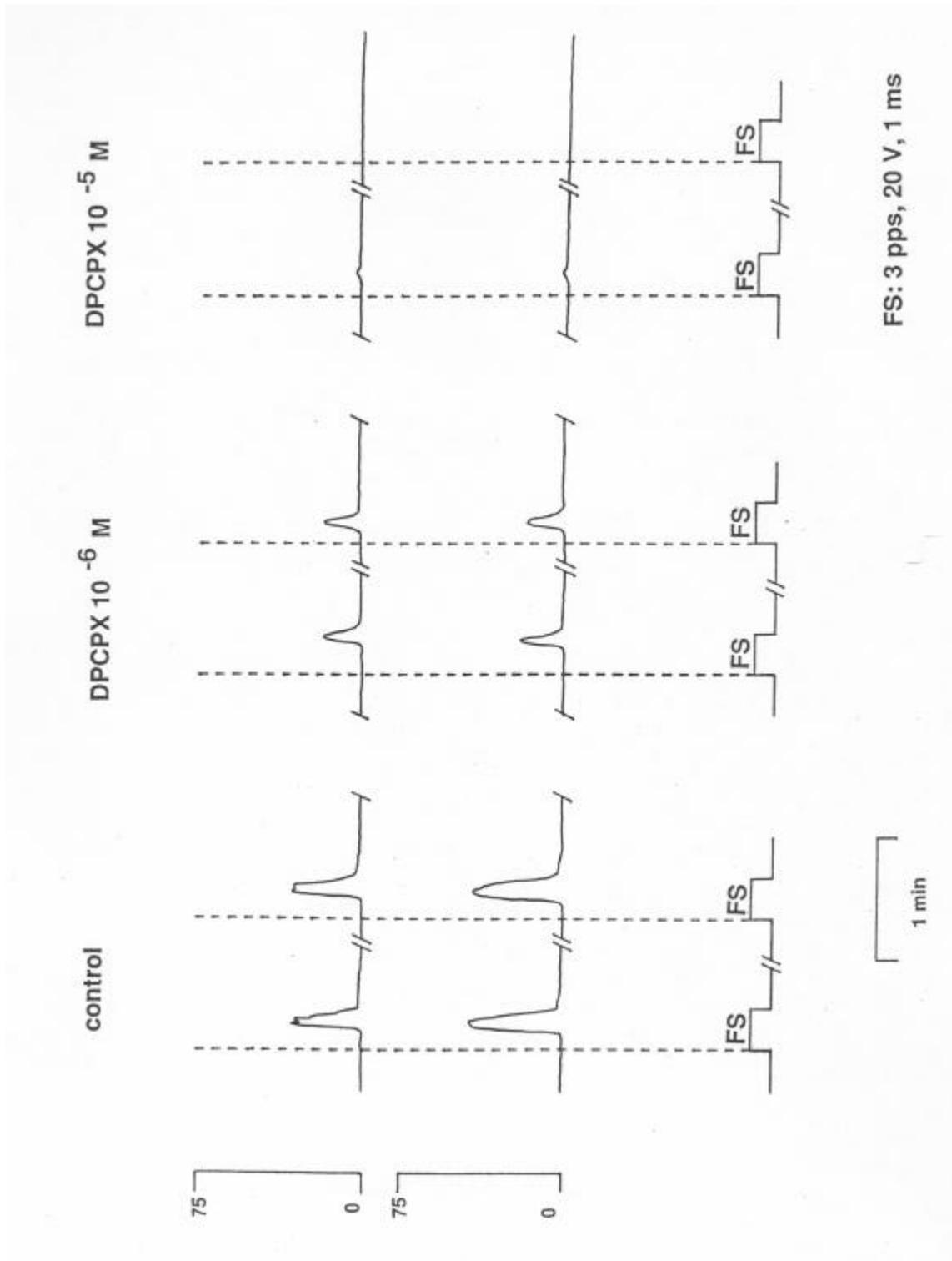
Tabelle 7:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M) (n = 11)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	504,5±81,3	100,0	494,5±79,4	100,0
$10^{-9}$	394,0±86,6*	78,1	394,2±80,3	79,7
$10^{-8}$	344,1±85,3*	68,2	369,7±74,4*	74,8
$10^{-7}$	299,6±54,1*	59,4	318,7±59,6*	64,4
$10^{-6}$	238,1±39,5*	47,2	237,0±46,1*	47,9
$10^{-5}$	122,1±41,5*	24,2	126,8±46,3*	25,6
Auswaschen	308,2±68,0	61,1	279,4±72,0	56,5

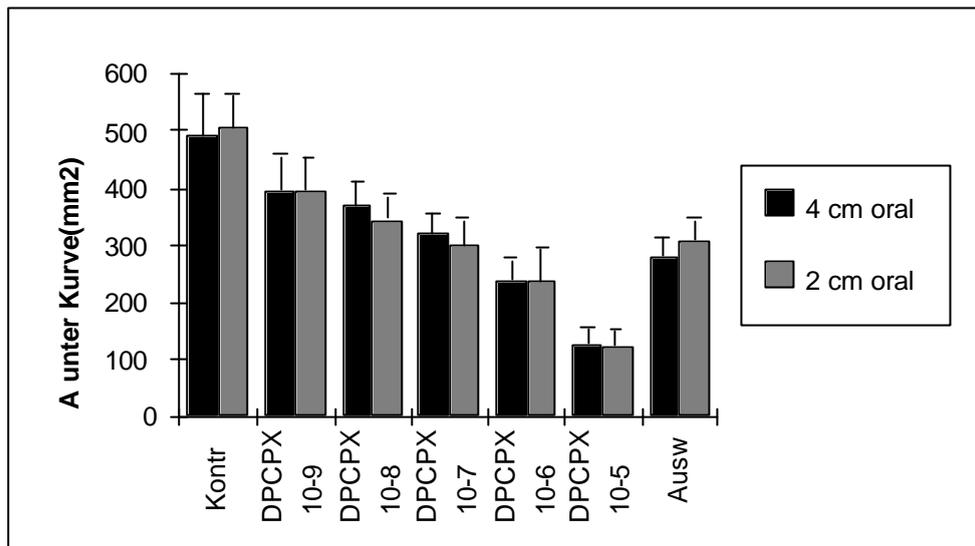
  

Friedman/Varianzanalyse	Varianzanalyse
Chi-Zahl=28,3	F=14,6, p<0,001
*:signifikant (p<00,05 im Dunnnett-Test) unterschiedlich im Vgl. zur Kontrolle	*:signifikant (p<0,05 im Tukey-Test) unterschiedlich im Vgl. zur Kontrolle



**Abbildung 6:**

Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von DPCPX ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes.



**Abbildung 7:**

Graphische Darstellung des Einflusses von DPCPX ( $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M und  $10^{-5}$ M) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

### 3.4.1.3. Der A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosin (CPA) in Kombination mit dem A<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX)

Wie erwartet konnte mit CPA zunächst eine Steigerung der Kontraktionskraft erreicht werden, die mit den Konzentrationen  $10^{-14}$  M bis  $10^{-8}$  M getestet wurde. Die Zugabe von DPCPX nach Vorbehandlung mit CPA ergab eine extrem starke Reduktion der Kontraktionsstärke auf

Werte, die weit unter den Ausgangswerten, vor Zugabe von CPA, lagen. DPCPX wurde in den Konzentrationen von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-5}$  M verwendet. Die Reduktion der Stimulationsantwort war nach CPA im Vergleich zu der letzten CPA-Zugabe deutlich signifikant ( $p=0,0009$ ). Auch im Vergleich zu den Kontrollwerten vor CPA ist die letzte DPCPX-Zugabe signifikant ( $p=0,03$ ).

Tabelle 8:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von N6-Cyclopentyladenosin (M) und 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M) ( $n = 6$ )

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	379,7±100,0	100,0	385,7±109,8	100,0
CPA				
$10^{-14}$	495,2±128,3	130,4	510,8±132,1	132,4
$10^{-12}$	454,0±95,2	119,6	562,3±104,2	145,8
$10^{-10}$	567,2±96,0	149,4	596,5±97,8*	154,7
+DPCPX				
$10^{-7}$	445,2±43,7	117,3	453,7±71,8	117,6
$10^{-6}$	326,2±62,8	85,8	323,7±77,9 <sup>+</sup>	83,9
$10^{-5}$	110,6±26,9	29,1	90,2±40,2 <sup>+</sup>	23,4
Auswaschen	281,6±58,3	74,2	292,8±93,1	75,9

n.s.

Varianzanalyse:

F=4,6,  $p=0,004$

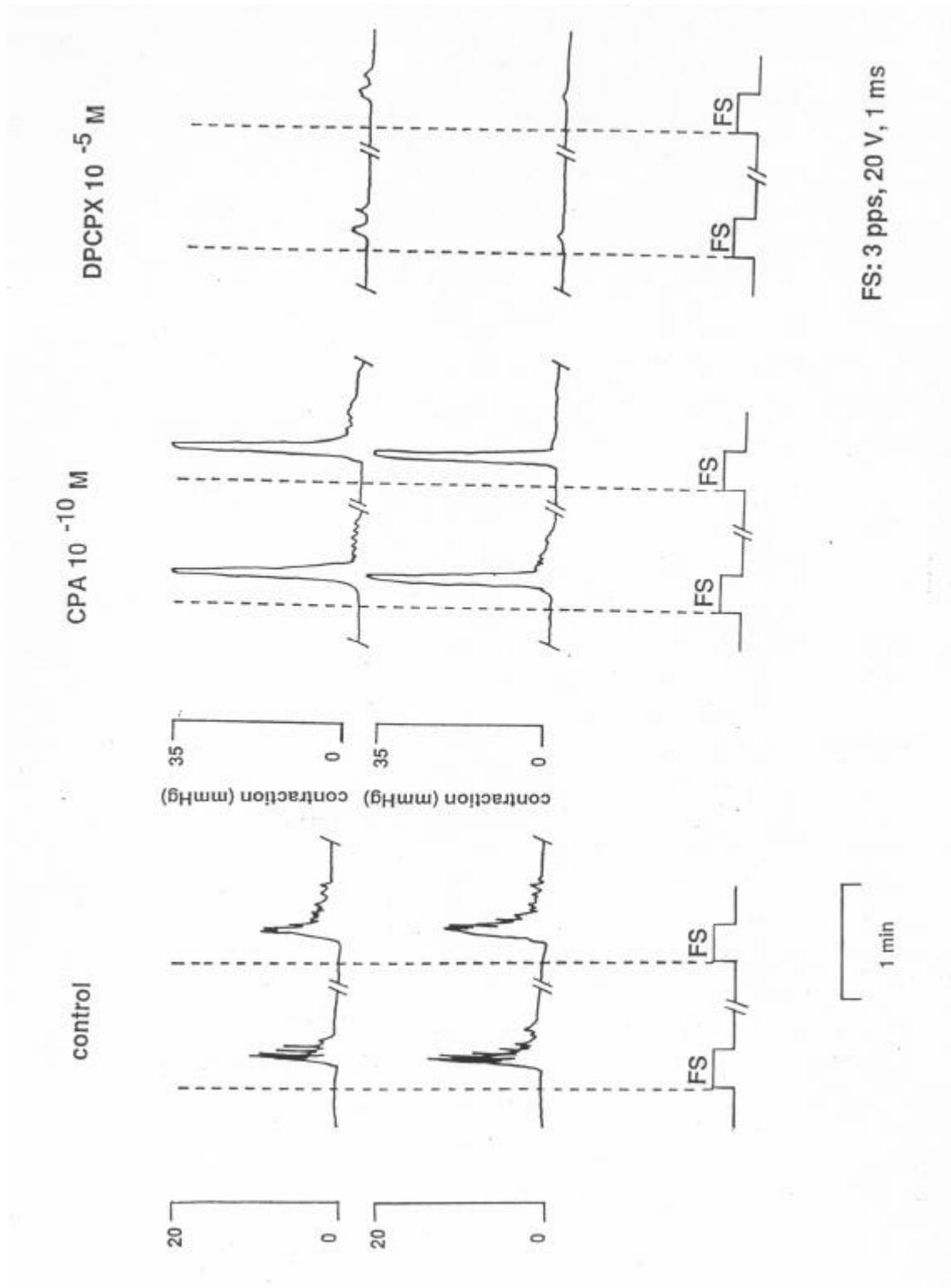
\*: signifikant ( $p<0,05$  im Dunnett-Test)

unterschiedlich im Vgl. zur Kontrolle

<sup>+</sup>: signifikant ( $p<0,05$  im Dunnett-Test)

unterschiedlich zu CPA  $10^{-10}$ M





**Abbildung 8:**

Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von CPA ( $10^{-10}\text{M}$ ) und nachfolgender DPCPX-Zugabe ( $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes.

Um den Einfluß von A<sub>1</sub>-Rezeptoren auf die Spontankontraktionen zu untersuchen, wurde die Wirkung von CPA+DPCPX auch ohne elektrische Feldstimulation untersucht.

Es zeigte sich ein Auftreten von Eigenkontraktionen in mit der Dauer des Versuches zunehmender Häufigkeit.

Tabelle 9:

Frequenz der Eigenkontraktionen (Anzahl pro Minute) ohne elektrische Feldstimulation vor und nach Zugabe von N<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin (M) und 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M) (n = 6)

	/ Min	%
Kontrolle	0,2	100,0
CPA		
10 <sup>-14</sup>	0,2	100,0
10 <sup>-12</sup>	0,2	100,0
10 <sup>-10</sup>	0,4	200,0
+DPCPX		
10 <sup>-7</sup>	0,6	300,0
10 <sup>-6</sup>	0,9	450,0
10 <sup>-5</sup>	1,0	500,0
Auswaschen	0,4	200,0

**3.4.1.4. Der A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist N6-Cyclopentyladenosin (CPA) in Kombination mit dem A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX) und dem A<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX)**

Um eine mögliche Interaktion von CPA mit dem A<sub>2</sub>-Rezeptor auszuschließen, wurde der Effekt von CPA auch unter Zugabe des A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten DMPX untersucht.

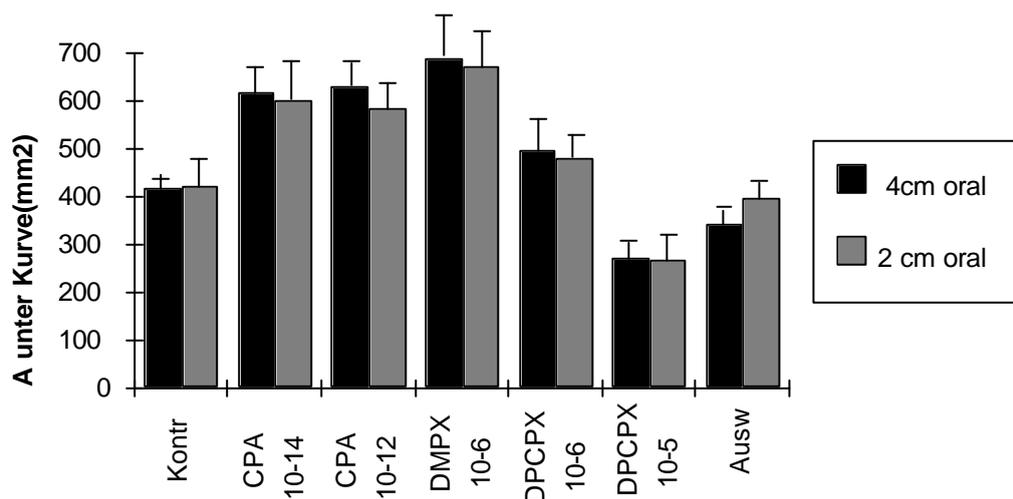
Die stimulierende Wirkung von CPA wurde durch Hinzufügen von DMPX zur Pufferlösung (in der Konzentration 10<sup>-6</sup> M) nicht signifikant verändert. Es kam keinesfalls zu einer blockierenden Wirkung, sondern der stimulierende Effekt wurde noch etwas verstärkt. Die daraufhin erfolgende Zugabe von DPCPX brachte die erwartete starke Inhibition der Kontraktionsstärke (n=7).

Tabelle 10:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von N6-Cyclopentyladenosin (M), 3,7-Dimethyl-1-propargyl-xanthine (M) und 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M) (n = 6)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	422,9±94,8	100,0	414,4±82,8	100,0

CPA				
10 <sup>-14</sup>	598,4±129,9	141,5	617,7±129,1	149,0
10 <sup>-12</sup>	583,4±119,9	138,0	629,2±179,2	151,8
+DMPX				
10 <sup>-6</sup>	672,3±124,8	159,0	690,3±149,6	166,6
+DPCPX				
10 <sup>-6</sup>	476,6±104,2	113,0	495,1±133,3	119,5
10 <sup>-5</sup>	265,0±55,5	62,7	270,7±77,1	65,3
10 <sup>-4</sup>	62,0±58,3	14,7	66,0±60,5	15,9
Auswaschen	392,6±60,5	92,8	341,3±50,8	82,4



**Abbildung 9:**

Graphische Darstellung des Einflusses von CPA ( $10^{-14}\text{M}$ ,  $10^{-12}\text{M}$ ) und anschließender DMPX- ( $10^{-6}\text{M}$ ) und DPCPX- ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ) Zugabe auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

Diese Daten belegen, daß die CPA Wirkung nicht durch eine Interaktion mit dem  $A_2$ -Rezeptor zustande kommt. Eine blockierende Wirkung von CPA auf den  $A_2$ -Rezeptor kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

### **3.4.2. $A_2$ -Rezeptor-Agonist- und Antagonist**

#### **3.4.2.1. Der $A_2$ -Rezeptor-Agonist 5'-(N-Cyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA)**

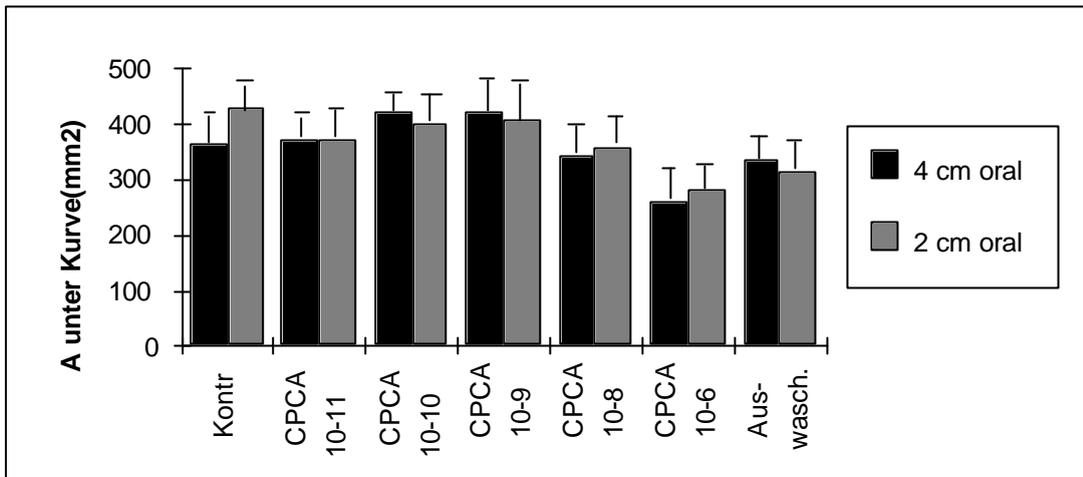
Es handelt sich bei dieser Substanz chemisch gesehen genau um 1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-N-cyclopropyl-1-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranuronamide. Bei der mit CPCA alleine durchgeführten Versuchsreihe (n=8) wurde mit Konzentrationen von  $10^{-11}\text{M}$  bis  $10^{-6}\text{M}$  gearbeitet. Es zeigte sich insgesamt eine Tendenz zu einer Reduktion der Reflexantwort. Dieses Ergebnis war jedoch statistisch nicht signifikant.

Wenn man den Verlauf im Einzelnen betrachtet zeigte sich bei  $10^{-11}\text{M}$  zunächst ein Abfall der Kontraktionsstärke. Die Reflexantwort nahm dann wieder etwas zu, blieb jedoch niedriger als der Ausgangswert, um ab  $10^{-8}\text{M}$  wieder abzufallen. Bei der Aufzeichnung 4cm oral kommt es schon bei der Konzentration  $10^{-11}\text{M}$  zu einem vorübergehenden leichten Ansteigen der Kontraktionsantwort, die bis  $10^{-9}\text{M}$  noch zunimmt, um dann auf Werte die wesentlich niedriger sind als der der Kontrolle abzufallen. Dieses biphasische Verhalten von CPCA wiederholte sich in den späteren Versuchen, in denen CPCA mit anderen Stoffen kombiniert wurde, nicht. Auch dort zeigte CPCA eine trendmäßige Inhibition der Kontraktionsantwort.

Tabelle 11:

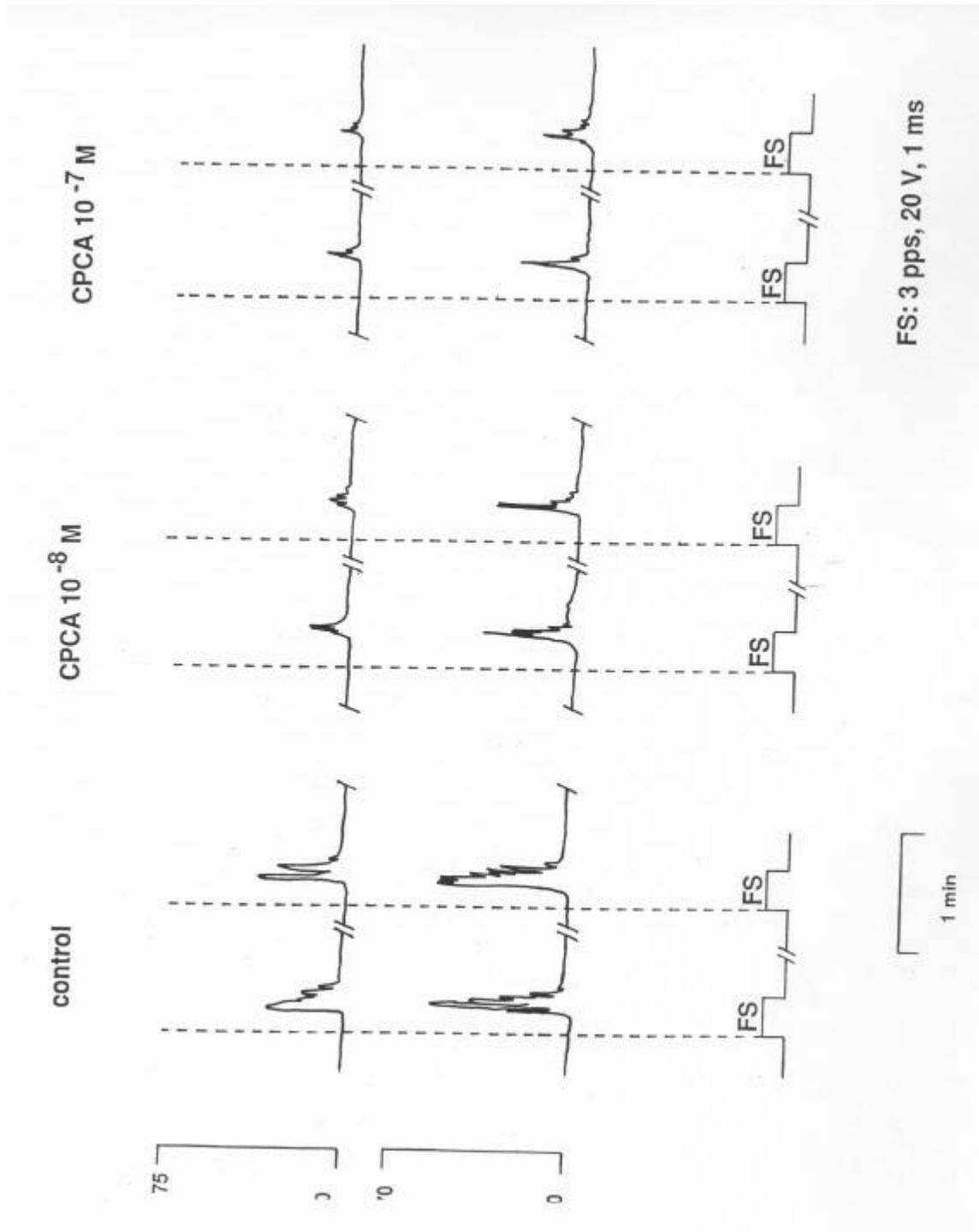
Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 5'-(NCyclopropyl)carboxamidoadenosine (M) (n = 8)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	428,9±81,7	100,0	362,8±68,6	100,0
10 <sup>-11</sup>	370,4±77,0	86,4	373,4±94,6	102,9
10 <sup>-10</sup>	400,4±119,0	93,4	420,3±108,7	115,8
10 <sup>-9</sup>	406,8±130,2	94,8	422,0±129,5	116,3
10 <sup>-8</sup>	359,1±113,7	83,7	341,8±117,7	94,2
10 <sup>-6</sup>	247,9±89,9*	66,0	231,9±99,2*	72,4
Auswaschen	313,3±86,6	73,0	334,4±102,5	92,2
	Varianzanalyse F=3,1, p=0,05 *: signifikant (p<0,05 im Dunnett-Test) unterschied- lich im Vgl. zur Kontrolle		Varianzanalyse F=3,3, p=0,039 *: signifikant (p<0,05 im Dunnett-Test) unterschied- lich im Vgl. zur Kontrolle	



**Abbildung 10:**

Graphische Darstellung des Einflusses von CPCA ( $10^{-11}M$ ,  $10^{-10}M$ ,  $10^{-9}M$ ,  $10^{-8}M$  und  $10^{-6}M$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).



**Abbildung 11:**

Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von CPCA ( $10^{-8}M$ ,  $10^{-7}M$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes.

### 3.4.2.2. Der A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)

DMPX wurde für die Versuche in den Konzentrationen 10<sup>-15</sup> M bis 10<sup>-7</sup> M verwendet. DMPX stimulierte bis zur Konzentration 10<sup>-11</sup> M stark, und diese Wirkung wurde danach etwas geringer. Insgesamt zeigte sich, daß DMPX eine deutlich stimulierende Wirkung mit einem Maximum bei 10<sup>-13</sup> M zeigte. Nach mehrmaligem Auswaschen mit physiologischer Pufferlösung konnte die DMPX-Wirkung völlig aufgehoben werden.

Tabelle 12:

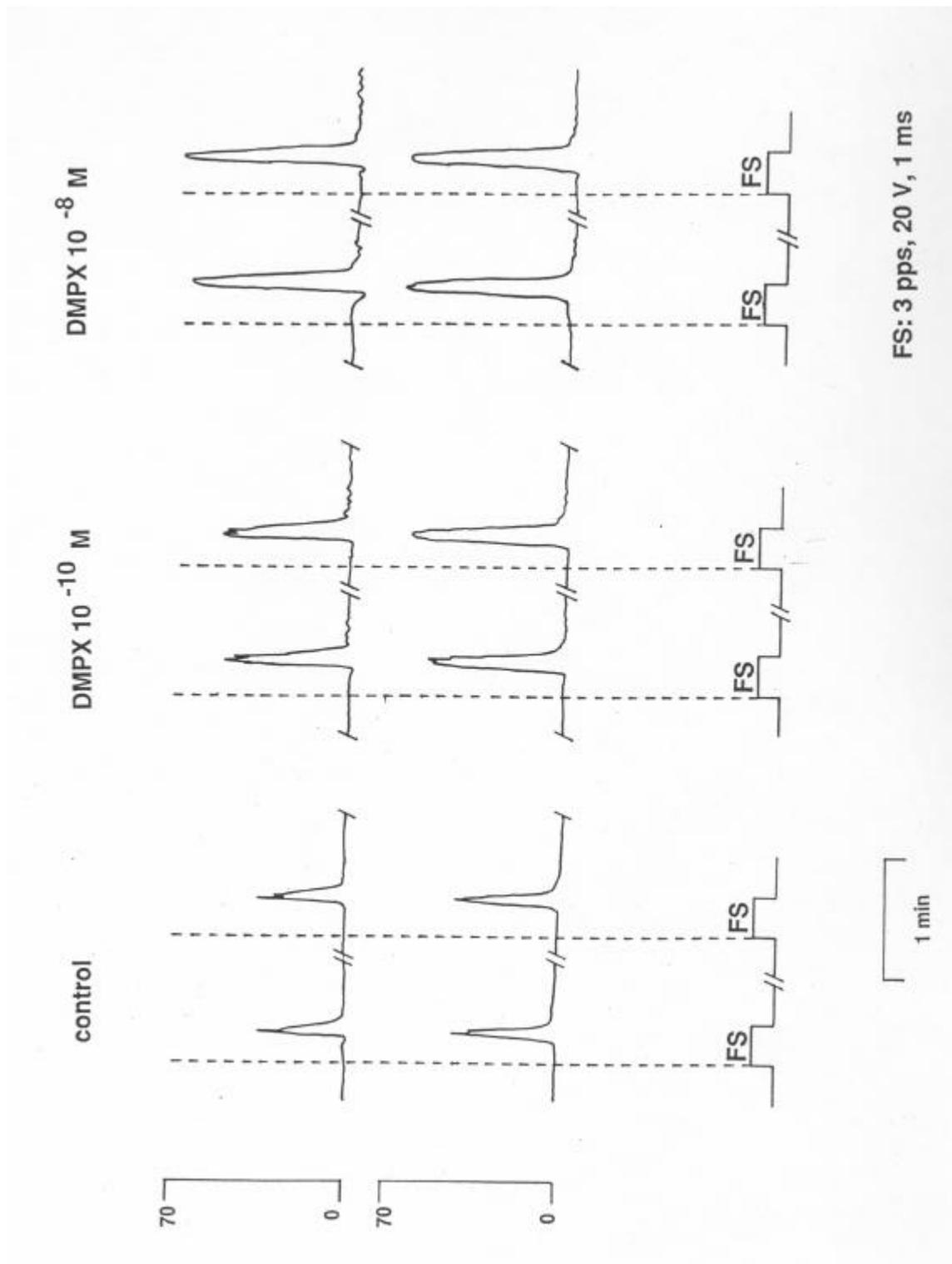
Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.M. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (M) (n = 10)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	273,6±53,6	100,0	337,3±67,3	100,0
DMPX				
10 <sup>-15</sup>	400,7±72,1	146,5	520,1±88,7	154,2
10 <sup>-13</sup>	456,5±86,5*	166,8	559,4±108,7*	165,8
10 <sup>-11</sup>	477,6±95,1*	165,4	578,8±121,1*	159,7
10 <sup>-9</sup>	427,3±82,1	156,2	500,0±116,5	141,9
10 <sup>-7</sup>	411,1±106,7	150,3	452,6±129,2	134,2
Auswaschen	255,7±66,9	93,5	270,1±73,0	80,1
	Varianzanalyse F=3,6, p<0,006 *: signifikant (p<0,05 im		Varianzanalyse F=2,5, p<0,046 *: signifikant (p<0,05 im	

Dunnett-Test) unterschied-  
lich im Vgl. zur Kontrolle

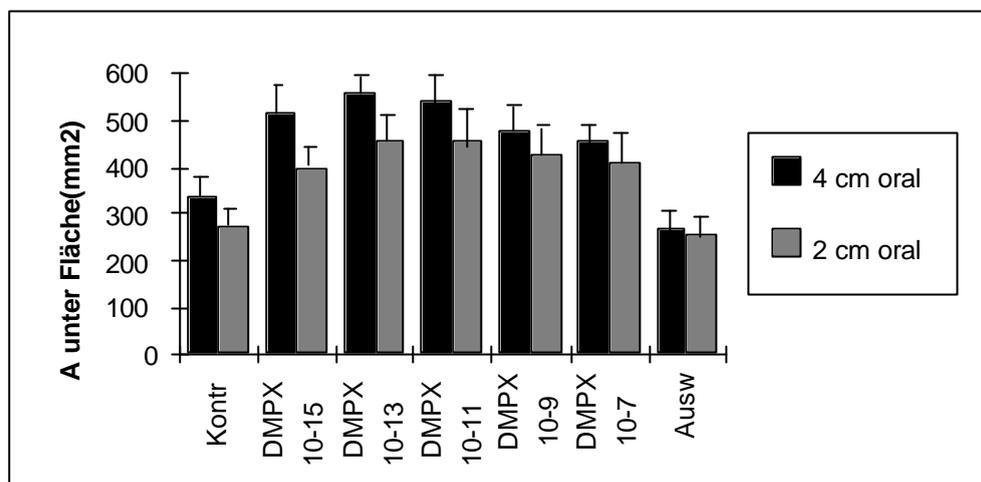
Dunnett-Test) unterschied-  
lich im Vgl. zur Kontrolle

---



**Abbildung 12:**

Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von DMPX ( $10^{-10}$ M,  $10^{-8}$ M) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes



**Abbildung 13:**

Graphische Darstellung des Einflusses von DMPX ( $10^{-15}\text{M}$ ,  $10^{-13}\text{M}$ ,  $10^{-11}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$  und  $10^{-7}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

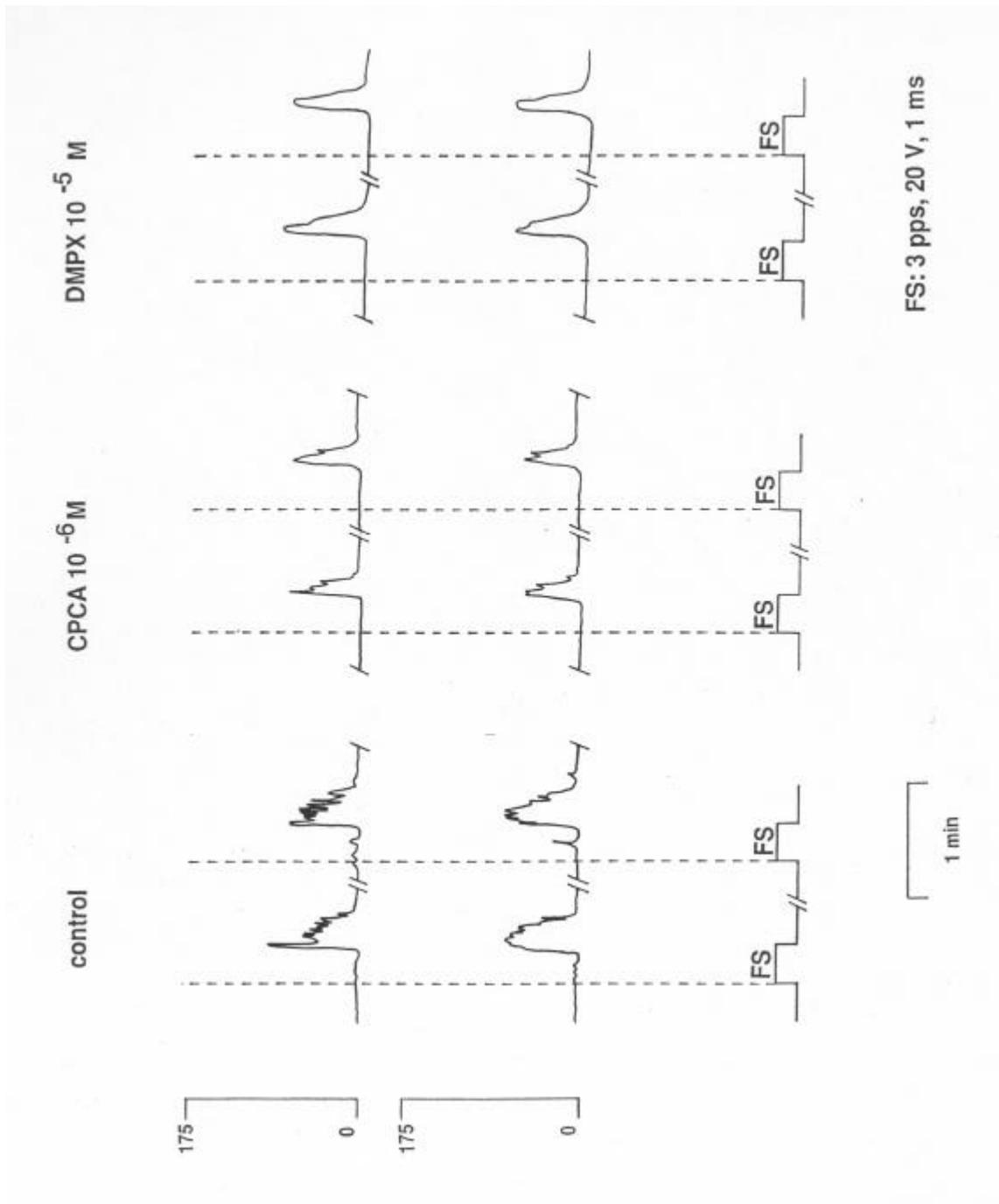
### 3.4.2.3. Der $A_2$ -Rezeptor-Agonist 5'-(NCyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA) in Kombination mit dem $A_2$ -Rezeptor-Antagonisten 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)

Die CPCA-Zugabe führte zu einer Reduktion der Stimulationsantwort, während DMPX eine umgekehrte Wirkung zeigte. DMPX konnte jedoch die CPCA-Wirkung nur teilweise antagonisieren. Nach Auswaschen war zudem noch eine weitere Abnahme der Kontraktionsstärke zu verzeichnen.

Tabelle 13:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 5'-(NCyclopropyl)carboxamidoadenosine (M) und 3,7-Di-methyl-1-propargylxanthine (M) (n = 6)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	443,3±148,1	100,0	574,2±162,6	100,0
CPCA				
10 <sup>-8</sup>	375,7±112,9	84,8	437,8±122,9	76,2
10 <sup>-7</sup>	325,8±69,4	73,5	338,7±75,0*	59,0
10 <sup>-6</sup>	265,2±74,1	59,8	255,0±66,7*	46,8
+DMPX				
10 <sup>-6</sup>	304,8±76,7	68,8	332,3±70,6	57,9
10 <sup>-5</sup>	324,8±145,1	73,3	344,5±108,8	60,0
Auswaschen	233,7±58,4	52,7	259,5±56,5	45,2
	n.s.		Varianzanalyse F=5,3, p=0,002 *: signifikant (p<0,05 im Dunnett-Test) unterschiedlich im Vgl. zur Kontrolle	



**Abbildung 14:**

Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von CPCA (10<sup>-6</sup>M) und nachfolgender DMPX-Zugabe (10<sup>-5</sup>M) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes.

**3.4.2.4. Der A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist 5'-(NCyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA) in Kombination mit dem A<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX) und dem A<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)**

Um wieder eine Interaktion des A<sub>2</sub>-Agonisten mit dem A<sub>1</sub>-Rezeptor auszuschließen, wurde der CPCA-Effekt in Kombination mit dem A<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten DPCPX untersucht.

Dieser Kombinationsversuch ergab eine gewisse Kontraktilitätsabnahme, ausgelöst durch den A<sub>2</sub>-Agonisten, gefolgt von einer sehr deutlichen Verkleinerung der Kontraktilität bei Zugabe des A<sub>1</sub>-Antagonisten. Der zuletzt zugegebene A<sub>2</sub>-Antagonist konnte diese Wirkung wie erwartet aber nicht aufheben. Daß diese Tatsache nicht durch die Ermüdung des Darmes ausgelöst wurde zeigt sich daran, daß das Auswaschen der Wirkstoffe eine beachtliche Zunahme der Kontraktionsantwort bewirkte.

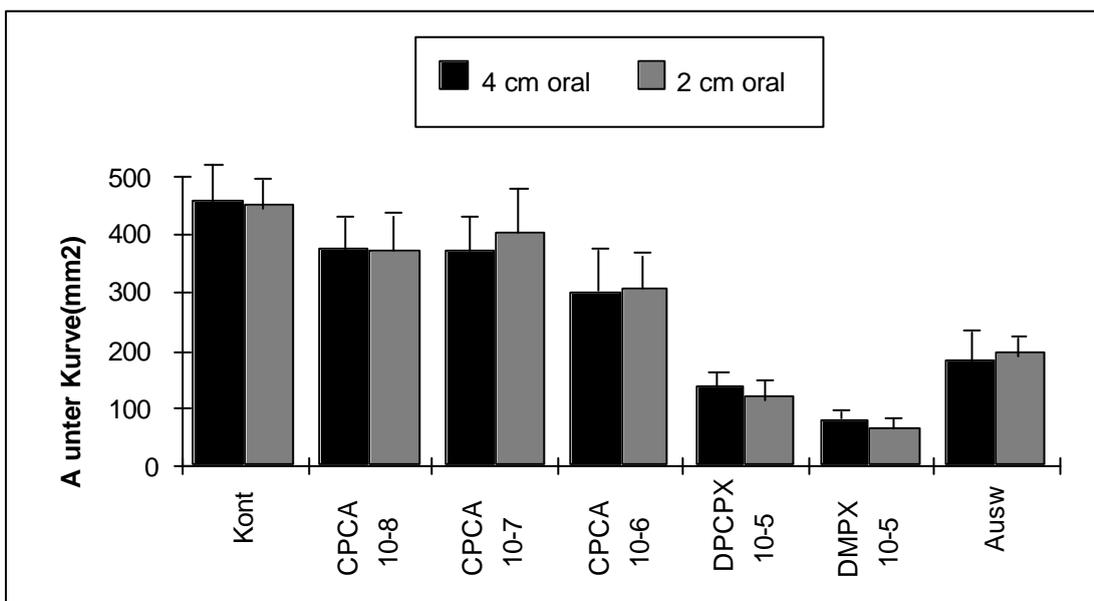
Tabelle 14:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm<sup>2</sup>) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 5'-(NCyclopropyl)carboxamidoadenosine (M), 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine und 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (M) (n = 7)

2 cm oral	%	4 cm oral	%
-----------	---	-----------	---

---

Kontrolle	448,0±47,5	100,0	460,1±46,2	100,0
CPCA				
10 <sup>-8</sup>	370,6±64,6	82,7	377,0±60,2	81,9
10 <sup>-7</sup>	405,5±71,9	90,5	372,0±75,5	80,9
10 <sup>-6</sup>	308,3±70,3	68,8	301,8±70,7	65,6
10 <sup>-5</sup>	395,5±59,6	88,3	333,0±33,9	72,4
+DPCPX				
10 <sup>-5</sup>	122,3±38,9	27,3	138,1±48,8	30,0
2*10 <sup>-5</sup>	53,0±30,2	11,8	91,0±25,6	19,8
+DMPX				
10 <sup>-5</sup>	64,1±19,1	14,3	81,4±19,6	17,7
Auswaschen	195,6±39,1	43,7	185,6±32,7	40,3



**Abbildung 15:**

Graphische Darstellung des Einflusses von CPCA ( $10^{-6}\text{M}$ ) und anschließender DPCPX- ( $10^{-5}\text{M}$ )- und DMPX- ( $10^{-5}\text{M}$ ) Zugabe auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

**3.4.2.5. Der  $A_2$ -Rezeptor-Agonist 5'-(NCyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA) in Kombination mit Apamin, einem Blocker von durch Calcium aktivierten Kaliumkanälen**

In dieser Versuchsreihe war die durch CPCA ausgelöste, von den Vorversuchen bekannte Inhibition sehr signifikant ( $p < 0,01$ ). Das anschließend zugegebene Apamin konnte die inhibitorische Wirkung des  $A_2$ -Agonisten teilweise wieder aufheben (signifikant). Vor allem am Meßpunkt 2cm oral war eine Zunahme der Kontraktionsantwort zu verzeichnen. Dies belegt, daß die inhibitorische Wirkung des  $A_2$ -Agonisten CPCA durch eine Aktivierung von Apamin sensitiven Calcium aktivierten  $K^+$ -Kanälen vermittelt wird.

Tabelle 15:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 5'-(NCyclopropyl)carboxamidoadenosine (M) und Apamin (M) ( $n = 7$ )

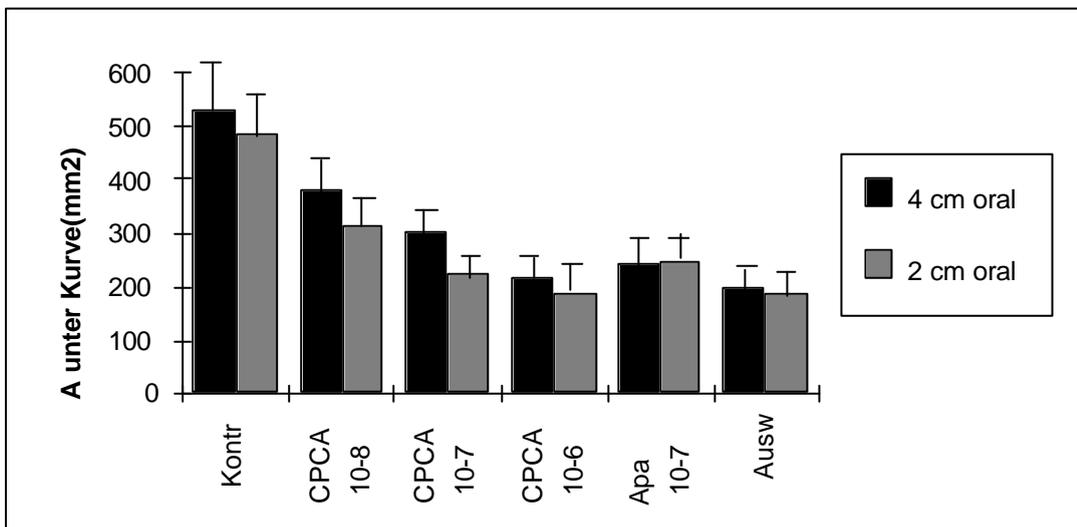
	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	485,0±110,7	100,0	533,9±88,0	100,0

CPCA

$10^{-8}$	315,4±88,4	65,0	381,0±92,1	71,4
$10^{-7}$	222,9±53,7	46,0	301,3±91,2	56,4
$10^{-6}$	191,7±41,9	39,5	220,9±61,7	41,4

+Apamin

$10^{-7}$	250,3±52,7	51,6	243,4±58,6	45,6
$10^{-6}$	319,0±42,4	65,8	199,0±38,2	37,3
Auswaschen	188,6±48,5	38,9	198,1±41,0	37,1



**Abbildung 16:**

Graphische Darstellung des Einflusses von CPCA ( $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M) und anschließender Apamin- ( $10^{-7}$ M)- Zugabe auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

### 3.4.3. Die Wirkung von endogenem und exogen zugeführtem ATP

#### 3.4.3.1. $\alpha, \beta$ -Methyladenosine-5'-Triphosphat, ein substituiertes ATP und Apamin

Die Gabe von  $\alpha, \beta$ -methyl-ATP, einem stabilen Analogon von ATP mit Selektivität für den  $P_2$ -Rezeptor bewirkte einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Rückgang der Kontraktionsstärke. Die anschließende zusätzliche Zugabe von Apamin führte zu einem weiteren deutlichen Ansteigen der unter der aufgezeichneten Kurve gemessenen Flächen. Dieser Teil des Versuchs war statistisch jedoch nicht signifikant.

Tabelle 16:

Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von  $\alpha, \beta$ -Methylenadenosine-5'-Triphosphat (M) und Apamin (M) (n = 9)

	2 cm oral	%	4 cm oral	%
Kontrolle	294,7±66,6	100,0	406,1±72,3	100,0
$\alpha, \beta$ -Met-ATP				
$10^{-9}$	206,3±36,5	70,0	301,6±62,5	74,3
$10^{-7}$	211,8±41,6	71,9	277,9±58,6	68,4
$10^{-5}$	243,8±43,6	87,7	234,5±85,2*	64,9

10 <sup>-4</sup>	170,4±48,9	57,8	148,0±44,5*	40,9
+Apamin				
10 <sup>-7</sup>	236,0±72,5	80,1	234,4±77,3	57,7
Auswaschen	219,0±75,0	74,3	242,1±85,3	59,6

---

n.s.

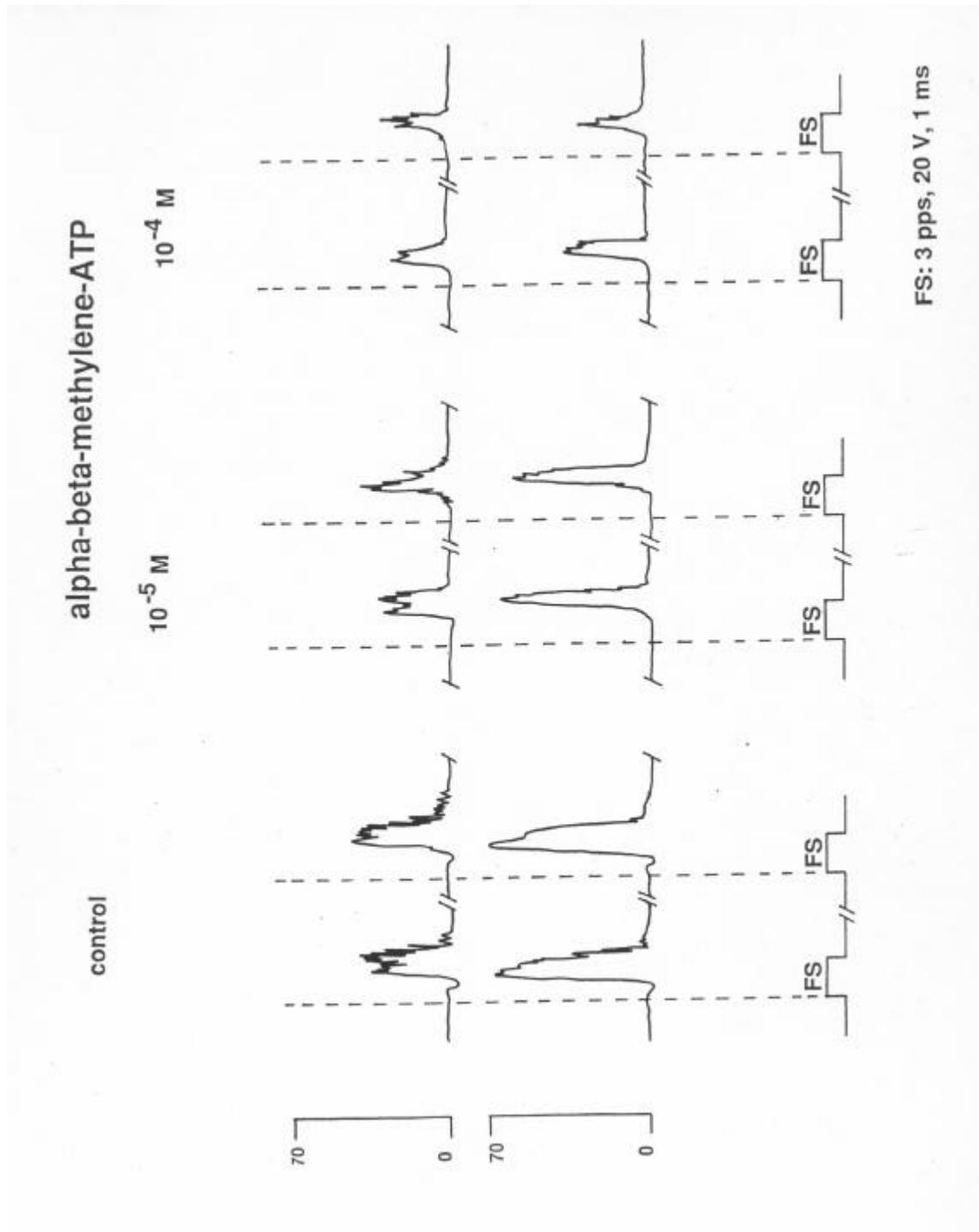
Varianzanalyse

F=4,7, p=0,002

\*: signifikant (p<0,05 im Dunnett-Test)

unterschiedlich im Vgl. zur Kontrolle

---



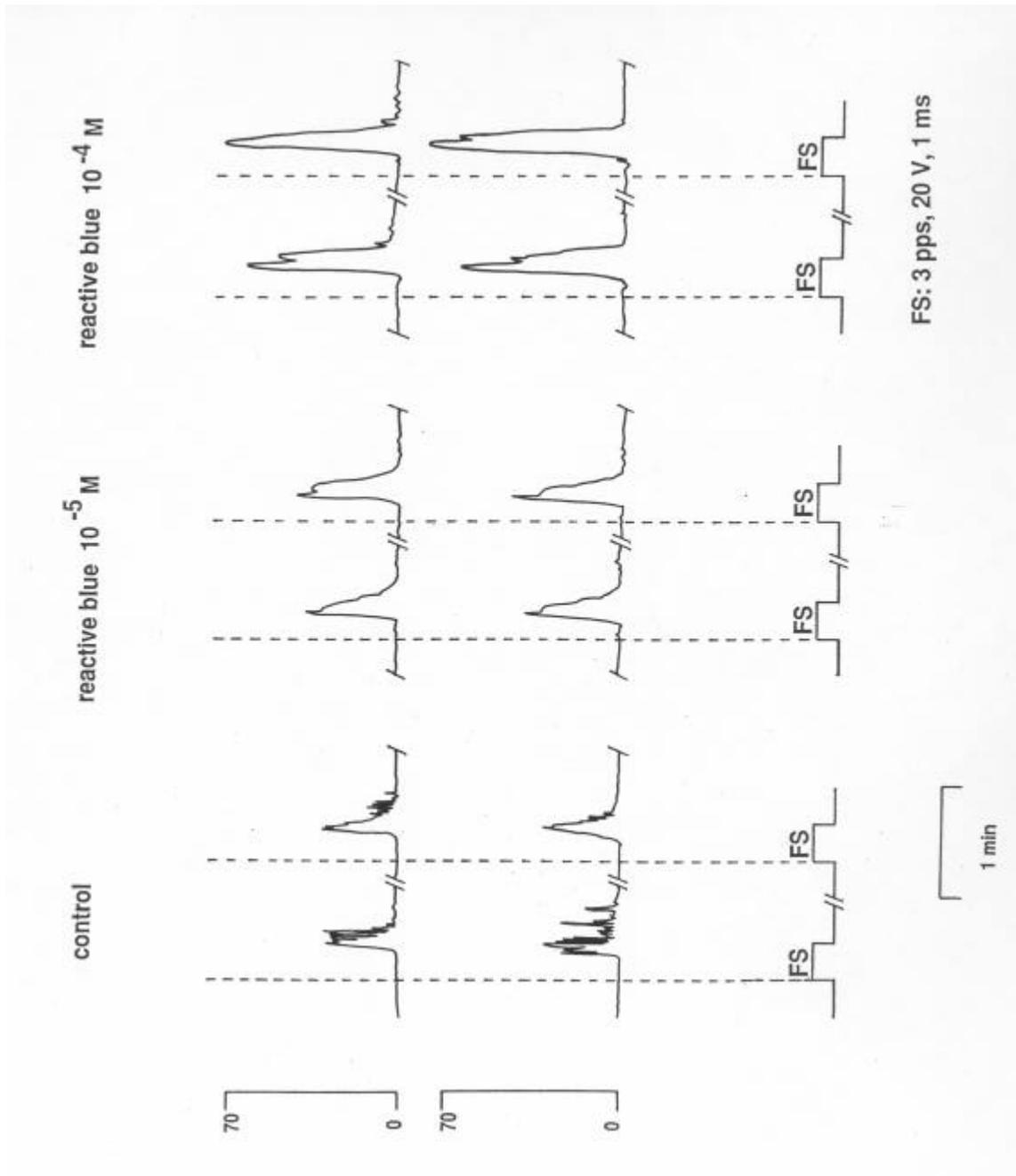
**Abbildung 17:**

Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von alpha-beta-methylene-ATP ( $10^{-5}\text{M}$  und  $10^{-4}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes.



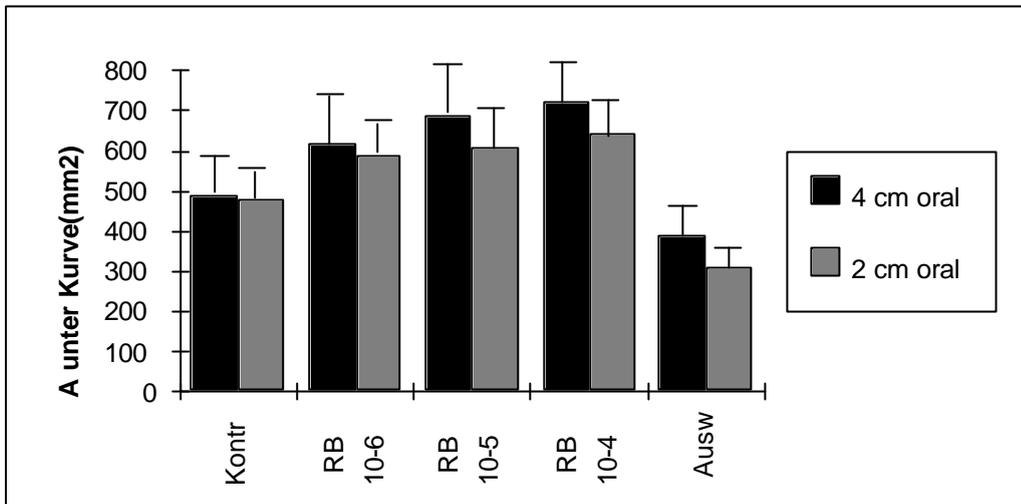
unterschiedlich im Vgl. zur Kontrolle

---



**Abbildung 18:**

Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von reactive blue 2 ( $10^{-5}\text{M}$  und  $10^{-4}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes.



**Abbildung 19:**

Graphische Darstellung des Einflusses von reactive blue 2 ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$  und  $10^{-4}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

## **4. Allgemeine Diskussion**

### **4.1. Untersuchungsobjekt Ileum**

#### **4.1.1. Anatomie des Ileum**

Alle Abschnitte des Verdauungskanals - Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Analkanal - haben einen im Prinzip gleichartigen Wandbau. Dieser modifiziert sich allerdings von Abschnitt zu Abschnitt. Gemeinsam sind folgende Schichten und Unterschichten:

- Tunica mucosa
  - # Epithelium mucosae
  - # Lamina propria mucosae
  - # Lamina muscularis mucosae
  
- Tela submucosa
  
- Tela muscularis
  - # Stratum circulare
  - # Stratum longitudinale
  
- Tunica adventitia

- Tunica serosa

Die Blutgefäße des Dünndarms treten durch die Muskulatur hindurch und bilden in der Submucosa einen größeren Plexus. Von hier aus ziehen Äste durch die lamina propria mucosae und weiter in die Zotten.

In der Wand des Dünndarms bestehen ausgedehnte Nervenplexus: der Plexus submucosus (Meissnerscher Plexus) in der Submucosa und der Plexus myentericus (Auerbachscher Plexus) zwischen der zirkulären und der longitudinalen Muskulatur, beide mit autonomen und vegetativen Anteilen. Gemäß Costa et al (Costa et al, 1987, S.10, 11, 12) werden die Ganglien der beiden Plexus durch kleine internodale Stränge verbunden und bilden mit ihren Fortsätzen das enterische Nervensystem.

#### **4.1.2. Das extrinsische Nervensystem**

Das extrinsische autonome Nervensystem hat einen bedeutenden Einfluß sowohl auf die motorischen wie auch auf die sekretorischen Funktionen des gesamten Magen-Darm-Traktes. Das enterische Nervensystem wird reich mit parasymphathischen und sympathischen Fasern versorgt. Über diese Steuerung läßt sich erklären, warum der Verdauungstrakt mit dem Gesamtorganismus mitreagiert, also beispielsweise in Stressituationen über den Sympathikus gehemmt wird. Das extrinsische autonome Nervensystem besteht aus den beiden Bestandteilen Sympathikus und Parasympathikus.

#### **4.1.2.1. Der Parasympathikus**

Präganglionäre Fasern des N. vagus aus der Medulla oblongata versorgen Ösophagus, Magen, Dünndarm sowie Leber, Gallenblase und Pankreas. Sigmoid, Rektum und die Analregion werden hingegen über präganglionäre Fasern aus dem Sakralmark gesteuert. Im Magen-Darm-Trakt enden beide an den Ganglien des intramuralen Plexus. Hier werden sie überwiegend über cholinerge, nikotinerge Rezeptoren auf postganglionäre Neurone umgeschaltet. Acetylcholin fungiert in diesem Fall als Überträgersubstanz. Es werden aber auch andere Transmitterstoffe von den präganglionären Vagusfasern freigesetzt. Auch postganglionär tritt Acetylcholin als ein möglicher Transmitter auf. Hier wird die Wirkung hauptsächlich über muskarinerge Rezeptoren vermittelt. Daneben findet man allerdings noch eine ganze Reihe anderer Neurotransmitter, die noch vorgestellt werden.

Die viszerale Afferenzen machen mehr als die Hälfte der Nn. vagi aus. Im Bereich des Magen-Darm-Traktes haben diese Afferenzen unter anderem mechanosensitive Eigenschaften und messen z.B. die Volumendehnung des jeweiligen Organs.

#### **4.1.2.2. Der Sympathikus**

In der intermediären Zone des Brust- und Lendenmarks findet man die Zellkörper der präganglionären Neurone des Sympathikus, die recht dünn, jedoch trotzdem myelinisiert sind und deswegen schnell, mit einer Geschwindigkeit von 1-20 m/s leiten können. Ihr Ausgangspunkt befindet sich an den Vorderwurzeln des Rückenmarks und den Rr. communicantes albi, von wo sie zu den Ganglien ziehen. Die Ganglien des Sympathikus teilen sich in die paaren paravertebralen Ganglien, die sich an beiden Seiten der Wirbelsäule zu den Grenzsträngen formieren und in die unpaaren prävertebralen Bauchganglien (Ganglion coeliacum, Ganglion mesentericum superior et inferior). Aus den Grenzsträngen gehen die postganglionären Axone ab. Diese sind noch dünner als die präganglionären Axone, sind unmyelinisiert und ziehen entweder über die Rr. communicantes grisei oder über spezielle Nerven zu den Effektororganen.

### 4.1.3. Das enterische Nervensystem

Wie schon erwähnt gibt es drei verschiedene Subgruppen des autonomen Nervensystems:

- sympathisches Nervensystem
- parasympathisches Nervensystem
- enterisches Nervensystem

Das enterische Nervensystem ist strukturell anders aufgebaut als die beiden anderen. Es ist in der Lage autonom, d.h. vom restlichen Organismus abgetrennt, die Funktion des Darmes, z.B. die Peristaltik, aufrechtzuerhalten. Das ist die Erklärung dafür, daß in den durchgeführten Versuchen das isolierte Ileumsegment noch lange Zeit im Organbad peristaltische Bewegungen vollführt.

Der Aufbau des enterischen Nervensystem besteht aus Reflexbögen mit sensorischen Neuronen, Interneuronen und motorischen Nerven. Diese verschiedenen Neurone zeigen strukturell auch unterschiedliche Charakteristika.

Das enterische Nervensystem ist ein komplexes neuronales Netzwerk, eingebettet in die Wand des Gastrointestinaltraktes (Costa et al, 1987, S.1). Es reicht vom Pharynx bis zum analen Sphinkter und besteht aus intrinsischen Neuronen und den Fortsätzen von afferenten und efferenten extrinsischen Neuronen. Das enterische Nervensystem besitzt zwei Plexus, die die Mikroganglien enthalten, die wiederum die Zellkörper der enterischen Neurone enthalten: der myenterische oder Auerbachsche Plexus und der submuköse oder Meissnersche Plexus. Zusätzlich gehen von diesen beiden Plexus kleinere Bündeln von Nervenfasern aus und bilden nichtganglionäre Plexus in der Longitudinalmuskulatur, der Zirkulärmuskulatur, im Bereich von Blutgefäßen und in der muscularis mucosae. Der Transport des Nahrungsbolus ist abhängig von der Tätigkeit des enterischen Nervensystems. Enterische Neurone tragen zudem zur Kontrolle der Freisetzung von gastrointestinalen Hormonen bei. Der Blutfluß im Gastrointestinaltrakt wird sowohl von intrinsischen als auch von extrinsischen Neuronen gesteuert. Die Koordination all dieser verschiedenen Funktionen benötigt eine ausgeprägte neuronale Integration. Die benötigten neuronalen Verbindungen

befinden sich im enterischen Nervensystem. Die beschriebenen Funktionen bestehen weiter, sogar wenn der Darm vom zentralen Nervensystem getrennt wird.

Laut Furness und Costa bezieht sich der Begriff enterischer Neuron auf alle Neurone deren Zellkörper sich im enterischen Nervensystem befindet (Furness et al, 1987, S.2). Die enterischen Neurone werden nach dieser Arbeit in drei Gruppen gegliedert: sensorische Neurone, Interneurone und motorische Neurone. Die sensorischen Neurone messen Faktoren wie etwa die Spannung der Darmwand oder die chemische Zusammensetzung des Darminhaltes. Die Interneurone unterhalten die Informationsvermittlung zwischen den enterischen Neuronen. Die motorischen Neurone schließlich bewirken Änderungen der Aktivität des Darmes, wie etwa die Auslösung von Muskelkontraktionen, von Gefäßdilatationen oder des Transportes von Wasser oder Elektrolyten im Bereich der Mukosa. Im enterischen Nervensystem sind sowohl exzitatorische als auch inhibitorische motorische Neurone, die zum Muskel führen zu finden. Zudem beschreiben Furness und Costa sekretomotorische Neurone, die zur Mukosa führen und enterische vasodilatatorische Neurone (Furness et al, 1987, S.2).

Die Grundlage der rhythmischen Darmkontraktionen bilden sogenannte "slow-waves" ("langsame Wellen"). Hierbei handelt es sich um regelmäßige Änderungen der Membranpotentiale der Zellwand. Die "slow waves" stehen in engem Zusammenhang mit den "Interstitial cells of Cajal", die als Generatoren dieser langsamen Wellen fungieren. Diese bekommen neurale Innervation und zeigen enge Membrankontakte ("Gap junction"-Kontakte) zur glatten Muskulatur. In Sphinkterregionen scheint es so zu sein, daß diese "Interstitial cells of Cajal" als elektrische Vermittler zwischen Nervenstrukturen und den Zellen der glatten Muskulatur fungieren (Allescher et al, 1988, S.G451). Die nervale Versorgung determiniert nach Furness und Costa (Furness et al, 1987, S.175) den Grad der Erregbarkeit und die Länge der erregten Region, während die "slow waves" die Frequenz der Kontraktion in dieser Region festlegen. Wenn exzitatorische Neurone auf einen kurzen Darmbezirk einwirken (3-4mm), dann wird jede "slow wave" in eine Kontraktion verwandelt, sodaß eine rhythmische Kontraktionsserie die Folge ist. Die Frequenz der "slow waves" nimmt innerhalb eines Spezies von oral nach anal ab (Szurszewski et al, 1987, S.383). Das ist ein Grund dafür, daß die Bewegung des Nahrungsbreis von oraler in aborale Richtung erfolgen kann. Um eine effektive Kontraktion zu erzielen sind jedoch zusätzlich zu den "slow waves" neurale Erregungen der glatten Darmmuskulatur notwendig. "Slow waves" alleine bewirken lediglich eine rhythmische Bewegung des Darmes ohne propulsive oder mechanische Funktion (Weisbrodt et al, 1987, S.655).

#### **4.1.3.1. Der "migrierende Motorkomplex"**

Klar zu trennen von der peristaltischen Funktion ist der sogenannte migrierende Motorkomplex.

Vom Ösophagus in Richtung terminales Ileum kommt es in regelmäßigen Abständen zu einer periodischen kontraktile Aktivität. Bei Fleischfressern, wie Mensch und Hund treten diese periodischen Wellen in ungesättigtem Zustand auf. Bei Pflanzenfressern, wie Schaf und Meerschweinchen treten diese sogenannten "migrierenden Motorkomplexe" sowohl in nüchternem als auch in gesättigtem Zustand auf. Dieses schon 1905 von Boldyreff entdeckte Phänomen wird in drei verschiedene Aktivitätsphasen unterteilt:

- Phase 1: kaum Aktionen des Darmes
- Phase 2: Kontraktionen der Darmmuskulatur in ungleichen Abständen
- Phase 3: lang anhaltende Phase mit vollkommen regelmäßigen Kontraktionen der Ringmuskulatur

Durch die bekannten Hemmstoffe Hexamethonium und Atropin sind die "migrierenden Motorkomplexe" zu blockieren, sodaß es dann nicht zu einer weiteren Ausbreitung der Kontraktion kommen kann (Furness et al, 1987, S.169; Code et al, 1975, S.291). Man weiß aber auch, daß das Auftreten von "migrierenden Motorkomplexen" an die Intaktheit des extrinsischen Nervensystems (N.vagus) und an zyklische Veränderungen von gastrointestinalen Hormonen (Motilin) gebunden ist bzw. diese hervorruft.

#### **4.1.3.2. Interstitial cells of Cajal**

Die Kenntnis der Funktion dieser Zellen ist für das Verständnis der physiologischen Abläufe während der Kontraktion des Ileum notwendig und soll aus diesem Grunde im Rahmen dieser Arbeit kurz erläutert werden.

Allescher et al untersuchten die Interstitial cells of Cajal im Ösophagus des Hundes. Sie stellten fest, daß hier die Nerven besonders häufig über diese Zellen miteinander in Kontakt stehen. Die Interstitial cells of Cajal gehen sowohl miteinander als auch mit glatten Muskelzellen gap junctions ein. Der elektronenmikroskopisch untersuchte Aufbau zeigte meist eine Zelle mit einer großen Kern-Plasma-Relation (Allescher et al, 1988, S. G446, G 449).

In ihrer 1998 erschienenen Arbeit untersuchen Lavin et al (Lavin et al, 1998, S.269), ob es "Interstitial cells of Cajal" gibt, die eine Immunreaktivität gegenüber Neurokinin 1 (NK1)-Rezeptoren besitzen. Es wurden "Interstitial cells of Cajal" im Bereich des myenterischen Plexus und des tiefen muskulären Plexus im Duodenum und Ileum des Meerschweinchens untersucht. Es zeigte sich, daß die NK1-Rezeptoren auf den "Interstitial cells of Cajal" eine Bindung von Substance P ermöglichen. Es scheint so zu sein, daß die "Interstitial cells of Cajal" exzitatorische Innervation über die nahe gelegenen Tachykinin enthaltenden Nervenfasern erhalten (Lavin et al, 1998, S.269).

Hanani et al gelang es 1998 die Morphologie der "Interstitial cells of Cajal" zu definieren. Bis zu diesem Punkt war es die Hauptschwierigkeit gewesen diese Zellen im intakten Gewebe darzustellen. Hanani et al konnten diese Zellen in der submukösen Zirkulärmuskulatur im frisch präpariertem Colon der Maus anfärben. Es zeigten sich zwei morphologische Zelltypen: ein bipolarer und ein multipolarer. Die bipolaren Zellen hatten zwei Fortsätze, die an beiden Polen eines langgezogenen Soma ansetzten. Die multipolaren Zellen hatten ein weniger langes Soma und besaßen 3-6 Fortsätze, die nicht in eine einheitliche Richtung abgingen. Durch elektronenmikroskopische Beobachtungen konnten Hanani et al zeigen, daß die hier untersuchten Zellen die typische Erscheinungsform der in früheren Untersuchungen beschriebenen "Interstitial cells of Cajal" hatten (Hanani et al, 1998, S.280).

Romert und Mikkelsen untersuchten in ihrer Arbeit 1998 durch c-kit Immunohistochemie unfixierte gefrorene Abschnitte im humanen Dünn- und Dickdarm. Die c-kit-immunreaktiven Zellen der muscularis externa der Darmwand zeigten sich als "Interstitial cells of Cajal" und Mastzellen. Die "Interstitial cells of Cajal" konnten aufgrund ihrer Morphologie, Lokalisation und Organisation aufgrund vorhergehender licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen identifiziert werden. Im Dünndarm waren die "Interstitial cells of Cajal" vor allem in der Nähe der Auerbachschen Plexus lokalisiert, während im Dickdarm die Lokalisation die Region der Auerbachschen Plexus der Zirkulärmuskulatur und die Taeniae der Longitudinalmuskulatur war. Die Morphologie der

"Interstitial cells of Cajal" war im Dick- und Dünndarm gleich, jedoch war ihre Verteilung unterschiedlich (Romert et al, 1998, S.199).

Welche Rolle spielen jedoch diese Zellen im Gastrointestinaltrakt? Die Aufgabe der "Interstitial cells of Cajal" ist eine Vermittlerposition zwischen der Zirkulär- und der Longitudinalmuskulatur im Colon des Kaninchens, wie Liu et al 1998 feststellten (Liu et al, 1998, S.69). Sie beobachteten, daß die Rolle dieser Zellen, die in Verbindung mit den Auerbachschen Plexus stehen, darin besteht, die Kommunikation zwischen den beiden Muskelschichten zu vereinfachen. Es kommt zu einer elektrischen Impulsübertragung zwischen den Muskelschichten. Die Art der Übertragung wurde durch Versuche mit Neurobiotin gezeigt. Hierbei wurde klar, daß eine direkte Übertragung zwischen Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur nicht möglich ist. Es findet immer Interaktion mit "Interstitial cells of Cajal" statt.

Es zeigte sich, daß eine reduzierte Anzahl oder das Fehlen von "Interstitial cells of Cajal" im Dünndarm oder im Colon eine normale peristaltische Aktivität nicht ermöglichen (Lavin et al, 1998, S.269). Abnormalitäten in der gastrointestinalen Motilität bei Neugeborenen können gemäß dieser Arbeit auch mit der verspäteten Ausbildung des Netzwerkes an "Interstitial cells of Cajal" zusammenhängen (Huizinga, 1998, S.G384).

Hagger et al unternahmen 1997 eine Literaturrecherche und trugen die in der Erforschung der "Interstitial cells of Cajal" erzielten Ergebnisse zusammen (Hagger et al, 1997, S.448).

Hierbei bestätigte sich, daß diese Zellpopulation eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Darmmotilität einnimmt. In Tierversuchen zeigte sich, daß die "Interstitial cells of Cajal" eine Funktion als Koordinator der Darmmotilität haben und als Vermittler in der neuralen Kontrolle des Darmes fungieren. Die Weiterentwicklung der Forschung in diesem Gebiet wird neue Möglichkeiten der Therapie von Krankheiten mit Darmmotilitätsstörungen eröffnen (Hagger et al, 1997, S.448).

#### **4.1.3.3. Transmittersubstanzen des enterischen Nervensystems**

##### Definition eines Neurotransmitters

Was versteht man überhaupt unter einem Neurotransmitter?

Im größten Sinne des Wortes kann man sagen, daß jeder Stoff, der aus einem Neuron freigesetzt wird und eine Wirkung auf diesen Neuron oder eine Zelle in der Nähe ausübt, als Neurotransmitter bezeichnet werden kann. Allerdings wurden eine ganze Anzahl von Arbeiten durchgeführt um den Begriff des Neurotransmitters eingrenzen zu können. In diesen Arbeiten wurden folgende Definitionskriterien (Furness et al, 1987, S.55) erarbeitet:

- a) ein Transmitter wird über den Syntheseweg identifiziert
- b) er wird nach der Synthese gespeichert und wenn benötigt freigesetzt
- c) es besteht ein Mechanismus zur Inaktivierung des Transmitters, z.B. durch Wiederaufnahme in die Speicher
- d) der Transmitter kann durch Agonisten imitiert werden
- e) er kann durch Antagonisten blockiert werden
- f) er hat bestimmte definierte Rezeptoren

Schließlich ist es auch bedeutend, daß die Wirkung des Transmitters in vitro, z.B. nach elektrischer Feldstimulation, mit der isolierten Substanz nachvollziehbar ist (Furness et al, 1987, S.55)

Die Ansicht es gebe im enterischen Nervensystem nur die beiden Neurotransmitter Noradrenalin und Acetylcholin ist seit längerer Zeit nicht mehr zu halten.

Im Gegenteil ist man zunehmend der Ansicht, daß Noradrenalin als Transmitter intrinsischer Neurone nur eine untergeordnete Rolle spielt. Es haben sich nach und nach eine Reihe von neuen Überträgersubstanzen im enterischen Nervensystem nachweisen lassen.

Zunächst soll der im autonomen Nervensystem wichtige Neurotransmitter ATP dargestellt werden.

### **ATP als Neurotransmitter im autonomen Nervensystem**

Noradrenalin und ATP werden im Bereich des sympathischen Nervensystems als Co-Transmitter nebeneinander freigesetzt und agieren synergistisch. Das Verhältnis der beiden Überträgersubstanzen kann natürlich sehr unterschiedlich sein und variiert stark von Organsystem zu Organsystem und von Spezies zu Spezies (Evans et al, 1992, S.424).

Wie ist der Zusammenhang der Freisetzung der beiden Neurotransmitter? In den sympathischen Nervenendigungen werden ATP und Noradrenalin in den selben Vesikeln gespeichert (Trachte, 1988, S.261), sodaß die Möglichkeit besteht, daß sie vollkommen parallel freigesetzt werden können. Jedoch stellte man fest, daß die Einwirkung von verschiedenen Neuromodulatoren auf die Nervenendigungen zu einer unterschiedlichen Ausschüttung von ATP und Noradrenalin führt. Bei den getesteten Substanzen handelt es sich um Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Prostaglandin E2 und Angiotensin II. Als Erklärungsansatz nimmt man an, es gäbe verschiedene Subtypen von sympathischen Nerven, wobei manche einen hohen prozentualen Anteil an ATP im Vergleich zu Noradrenalin haben, während bei anderen Noradrenalin überwiegt. Zudem sei die Regulation der ATP- und Noradrenalinfreisetzung durch ein wichtiges Neuropeptid genannt: Neuropeptid Y. Neuropeptid Y wird ebenfalls in den sympathischen Nerven gespeichert und freigesetzt und wirkt präjunktional als Modulator der Freisetzung von sowohl ATP als auch von Noradrenalin und beeinflusst postjunktional verstärkend die Wirkung dieser beiden Stoffe (Saville et al, 1990, S.117).

Schon in den 70-er Jahren fand man heraus, daß ATP im Darmtrakt als inhibitorischer NANC-Transmitter fungiert. Einige Jahre später wurde dann auch für das Vasoactive intestinale Peptid (VIP) in anderen Bereichen des Magen-Darmtraktes die selbe Funktion nachgewiesen.

Im autonomen Nervensystem geht man davon aus, daß ATP bei der NANC Übertragung in inhibitorischen Nerven, zusammen mit VIP und NO als Co-Transmitter auftritt (Rand, 1992, S.147). In unterschiedlicher proportionaler Verteilung, die vom Spezies und vom Darmabschnitt abhängig ist, verrichten diese drei Substanzen gemeinsam die NANC-Übertragung und üben eine sich gegenseitig unterstützende Wirkung aus (Saffrey et al, 1992, S.333).

Aber auch im Bereich von Motoneuronen kann man ATP, das gemeinsam mit Acetylcholin gespeichert und freigesetzt wird, finden (Hägglad et al, 1988, S.133). Die Rolle, die ATP dabei erfüllt, besteht in der Steuerung der Freisetzung von Acetylcholin. Daneben kommt es in diesem Rahmen auch zu einer Beeinflussung der Wirkung von Acetylcholin. Man konnte etwa nachweisen, daß ATP in kleinen Mengen, so wie auch Acetylcholin Ionenkanäle in der Membran von Myoblasten und Myozyten aktivieren kann.

Acetylcholin, das von enterischen exzitatorischen Motoneuronen an der intestinalen glatten Muskulatur, von vagalen und pelvinen Nerven und von exzitatorischen Interneuronen in den

Plexus freigesetzt wird, ist einer der wichtigsten exzitatorischen Transmitter. Acetylcholin konnte genauso wie das ihn synthetisierende Enzym Cholin-acetyltransferase in intrinsischen Neuronen nachgewiesen werden. Ebenfalls war es möglich die Freisetzung von Acetylcholin nach Nervenstimulation zu beweisen. Die Wirkung von Acetylcholin im Gastrointestinaltrakt kann durch Antagonisten, die auf die muskarinergen Rezeptoren wirken, blockiert werden. Auch Substanzen, die hemmend auf die nikotineren Rezeptoren wirken, wie etwa Hexamethonium üben einen inhibierenden Effekt aus. Acetylcholin wird im Darm vor allem im Bereich des myenterischen Plexus synthetisiert (Furness et al, 1987, S.55).

Bereits sehr früh erkannte man (Furness et al, 1987, S.55), daß der Effekt von Adrenalin oder verwandten Substanzen auf die Motilität des Magen-Darm-Traktes als Transmitter von postganglionären sympathischen Nerven eine große Rolle spielt. Als Transmittersubstanz konnte im Verlauf einwandfrei Noradrenalin nachgewiesen werden. Das Noradrenalin ist in fast allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes in Axonen enthalten, die von den Zellkörpern in extrinsische Ganglien ziehen. Besonders gehäuft kommen die noradrenergen Nervenfasern in den myenterischen und submukösen Ganglien und um die Arteriolen vor. Die zur Synthese von Noradrenalin notwendigen Enzyme Tyrosin-hydroxylase und Dopamin- $\beta$ -hydroxylase kommen beide im Darm vor.

Neben den bereits erwähnten gibt es eine ganze Reihe von weiteren Neurotransmittern (Allescher, Kurjak, 1991, S.127, 128). Zu diesen zählen Stickstoffmonoxyd (NO), Substance P und Substance K (Neurokinin A), Neuropeptid Y, Calcitonin-"gene-related peptide" (CGRP), die Opioidpeptide (Enkephaline, Dynorphine und Endorphine), das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Bombesin, das Gastrin-Releasing-Peptid (GRP) und die gastrointestinalen Hormone Cholezystokinin und Somatostatin, das aus dem Vorläufermolekül Pre-Pro-Somatostatin in zwei verschiedenen molekularen Formen freigesetzt wird.

Ebenfalls eine Doppelrolle als Hormon und Neurotransmitter erfüllen die beiden Substanzen Motilin und Neurotensin. Schließlich sei noch Neuropeptid Y erwähnt, das in enger Strukturverwandschaft steht mit dem Pancreatic-Polypeptide (PP) und mit Peptid YY. Das Vorkommen dieser Substanz ist in Zusammenhang mit Noradrenalin, sodaß eine Synergie der beiden Stoffe angenommen werden kann.

In den letzten Jahren wurde zusätzlich Stickstoffmonoxid als inhibitorischer NANC-Transmitter im Magen-Darm-Trakt identifiziert. Diese Substanz scheint eine wichtige Rolle bei der inhibitorischen NANC-Innervation im Magen-Darm-Trakt zu haben.

## **4.2. Der peristaltische Reflex**

### **4.2.1. Der die Muskelkontraktion auslösende Reiz und die notwendigen Rezeptoren**

Bereits Bayliss und Starling stellten in ihren Versuchen 1899 fest (Bayliss et al, 1899, S.99), daß das Aufpumpen eines intraluminal platzierten Ballons im denervierten Dünndarm des Kaninchens zu einer Kontraktion der Zirkulärmuskulatur oral und zu einer Relaxation anal führte. Falls der Ballon im Darm analwärts geführt wurde, zeigte sich eine Kontraktion hinter dem Ballon und eine Relaxation vor dem Ballon. Da die Muskelkontraktion durch neurale Antagonisten blockierbar war, wurde geschlossen, daß die Peristaltik durch eine Aktivierung von intrinsischen nervalen Wegen hervorgerufen wird.

Die Auslösung der Darmperistaltik erfolgt über Muskeldehnung und Stimulation der Mukosa über die Aktivierung von sensorischen Neuronen (Grider et al, 1993, S. 2854). Diese gehören zu einer Gruppe von enterischen motorischen Neuronen. In ihrer 1991 veröffentlichten Arbeit zeigen Smith et al (Smith et al, 1991, S.69) die verschiedenen Möglichkeiten auf, in der Zirkulärmuskulatur im Ileum des Meerschweinchens einen peristaltischen Reflex auszulösen. Die verwendeten Stimulationsmodi waren Dehnung des Darmes, mechanische Reizung der Villi durch eine kleine Bürste, sowie ein chemischer Stimulationsreiz mit Hilfe von 0,5M HCl. In allen Fällen wurden oral des Stimulationsortes exzitatorische Junktionspotentiale beobachtet, während anal des Stimulationsortes inhibitorische Junktionspotentiale auftraten. Es war bereits bekannt, daß die orale Stimulation durch Dehnung durch Acetylcholinausschüttung vermittelt wird. Smith et al konnten durch die Zugabe von  $10^{-6}$ M Hyoscine zeigen, daß die Reflexantwort nach mechanischer Stimulation der Mukosa zum Teil auf diese Weise hemmbar war. Sie folgerten daraus, daß diese Stimulationsantwort ebenfalls zum Teil, wenn auch nicht vollständig, durch Acetylcholin ausgelöst wird.

In Versuchen mit Hilfe von intrazellulären Microelektroden bzw. durch Aufzeichnung von Druckänderungen konnte laut Smith et al gezeigt werden, daß Dehnung oder Stimulation der Mukosa zu einem polarisierten Reflex führen. In der Zirkulärmuskulatur des Dün- und Dickdarms

zeigten sich oral sowie anal des Stimulus Kontraktionen verbunden mit "exzitatorischen Junctionspotentialen", sogenannten EJPs und Relaxationen verbunden mit "inhibitorischen Junctionspotentialen", sogenannten IJPs. Es wurden laut Smith et al zusätzlich EJPs beobachtet, die sich nach induzierten analen IJPs in der Zirkulärmuskulatur des Dünn- und Dickdarms manifestierten. Die Autoren schlossen daraus, daß Kontraktionen, die durch Aktivierung der deszendierenden exzitatorischen nervalen Stimulaton ausgelöst werden, auch eine bedeutende Rolle bei der Peristaltik spielen (Smith et al, 1998, S.564).

#### **4.2.2. Rolle der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur im Rahmen der Muskelkontraktion**

In den Arbeiten von Kosterlitz und Robinson wird zwischen zwei Typen der Kontraktion der Longitudinalmuskulatur im Bereich des Dünndarmes unterschieden (Kosterlitz et al, 1959, S.369). Zum einen handelt es sich um eine Kontraktion, die proportional von der Dehnung der Darmwand abhängt. Diese Kontraktionsantwort kann entweder durch geringfügige radiale Dehnung ausgelöst werden, oder aber bei höherer Dehnungsstärke wenn ganglienblockierende Substanzen gleichzeitig verwendet werden. Diese Art der Kontraktion der Longitudinalmuskulatur wird als Typ-I-Kontraktion bezeichnet.

Die Typ II-Kontraktion besteht in einer Alles-oder-Nichts-Antwort und ist die alternierende Antwort der Longitudinalmuskulatur auf die Kontraktion der Zirkulärmuskulatur bei einem vollständigen peristaltischen Reflex.

Die Typ I-Kontraktionen können als Basiskontraktion angesehen werden, auf die sich die Typ II-Kontraktionen aufpropfen. In den Momenten der Pausen der Typ II-Kontraktionen kommen laut Kosterlitz et al die Typ I-Kontraktionen zum Vorschein.

In Bezug auf die Innervation, die zu beiden Typen der Muskelantwort führt, habe man zunächst gefunden, daß die Typ I Kontraktionen zum Teil über cholinerge Nerven vermittelt werden, da sie durch Atropin reduziert werden, gegenüber Hexamethonium jedoch resistent sind.

Die Typ II-Kontraktionen werden im Gegensatz dazu durch Atropin und Hexamethonium reduziert oder ganz blockiert. Es handelt sich also hierbei um eine rein neurale Auslösung der Kontraktion. Dies führte zu der Vermutung, es müsse zwei verschiedene cholinerge Übertragungswege in der Longitudinalmuskulatur geben. Der eine geht wohl über eine cholinerge Synapse, während der andere über noncholinerge Synapsen führt oder monosynaptisch ist. Da die Reduzierung der präsynaptischen Acetylcholinausschüttung aus Nervenzellen durch Morphine zum Teil zu keiner Verminderung der Kontraktionsantwort führt, geht man davon aus, daß es einen nicht-cholinergen Innervationsweg in der Longitudinalmuskulatur im Dünndarm geben muß.

Man ging bis 1998 davon aus, daß die Kontraktion der Longitudinal- und der Zirkulärmuskulatur sequentiell erfolgt.

Smith et al stellten in ihrer Arbeit 1998 eine vollkommen neue These auf, indem sie behaupteten, daß der peristaltische Reflex aus der koordinierten Bewegung der Longitudinal- und der Zirkulärmuskulatur besteht (Smith et al, 1998, S.564). Wenn es z.B durch langsame Füllung zur Auslösung einer Peristaltik kommt, so kontrahiert sich synchron die Longitudinal- und die Zirkulärmuskulatur oral (aszendierende Exzitation) und relaxiert anal (deszendierende Inhibition) des Reizes. Es kommt so zu einer peristaltischen Welle. Der analen Relaxation folgt eine Kontraktion (deszendierende Exzitation) beider Muskelschichten. Die Wirkung ist der Transport des Darminhaltes analwärts.

Laut Smith et al werden die Longitudinal- und die Zirkulärmuskulatur des Darmes durch unterschiedliche Populationen von motorischen Neuronen innerviert (Smith et al, 1998, S.564). Beide Muskelschichten haben eine selbständige exzitatorische und inhibitorische Innervation, sodaß sie unabhängig voneinander agieren können. Slow waves kommen synchron in beiden Muskellagen vor. Allerdings führen die slow waves der Longitudinalmuskulatur häufiger zu Aktionspotentialen als die der Zirkulärmuskulatur, was wahrscheinlich der Grund dafür ist, daß die Longitudinalmuskulatur rhythmische Pendelbewegungen ausführt, während die Zirkulärmuskulatur seltener Kontraktionen zeigt (Smith et al, 1998, S.564).

#### **4.2.3. Die inhibierende Komponente des peristaltischen Reflexes**

Die 1993 erschienene Arbeit von Du et al betont die bedeutende Rolle der enterischen neuronalen Inhibition im Rahmen der Kontrolle der gastrointestinalen Motilität (Du et al, 1993, S.208). Hier werden zyklische Nukleotide, wie etwa cGMP oder cAMP als second messenger vieler inhibitorischer neuraler Antworten hervorgehoben. So betonen Smith et al, daß NO, eine Substanz die als Mediator von vielen inhibitorischen neuralen Antworten des Gastrointestinaltraktes gilt, eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels bewirkt (Smith et al, 1998, S.564). Viele derjenigen Rezeptoren, die an die Aktivierung von Adenylatzyklase gekoppelt sind, haben laut Smith et al eine  $\beta$ -Adrenoceptor-Stimulation, eine purinerge P1-Stimulation oder eine Stimulation von VIP-Rezeptoren. Wenn es zu einem Anstieg von cAMP in der Zelle kommt, führt dies zur Aktivierung einer c-AMP-abhängigen Proteinkinase, und dieser phosphoryliert zelluläre Proteine. Es kommt als Folge zu einer Hyperpolarisation der Membran, somit zu einer Herabsetzung der Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen  $Ca^{++}$ -Kanäle. Dies führt zu einer Reduktion des intrazellulären Calcium und damit zu einer Relaxation. Daneben gibt es noch andere, vom Membranpotential unabhängige Vorgänge, die zu einer Relaxation führten. So kommt es manchmal zu einer erniedrigten Empfindlichkeit der Myofilamente für Kalium oder zu einem erhöhten Transport von Calcium aus der Zelle. Somit könnten Agonisten, die die Adenylatzyklase aktivieren unter bestimmten Umständen, wenn keine Membranhyperpolarisation vorliegt, zu einer Relaxation führen.

### **4.3. Purine**

#### **4.3.1. Historischer Rahmen**

Die ersten Forschungsarbeiten über die extrazelluläre Wirkung der Purinnukleoside- und nukleotide geht in die dreißiger Jahre zurück. 1929 publizierten Drury und Szent-Györgyi (Drury et al, 1929, S.215) als erste zu diesem Thema.

Das weitere Interesse galt vor allem der Wirkung von Adenosin und ATP auf das kardiovaskuläre System und besonders ihre Fähigkeit einen Schock auszulösen, wobei

besonders die Arbeit von Green und Stoner zu erwähnen ist (Green et al, 1950, S.251). In die klinische Praxis wurde das erlangte Wissen bei geriatrischen Patienten mit Herz- Kreislauf-Problemen umgesetzt.

Die Beobachtung, daß Adenosin eine starke Vasodilatation bewirkt, führte Berne (Berne, 1963, S.319) zu der Vermutung, daß Adenosin der physiologische Mediator für koronare Vasodilatation bei einer myokardialen Hypoxie ist. Diese Theorie findet ihren Beweis in der Tatsache, daß die Abbauprodukte von Adenosin, Inosine und Hypoxanthine, im Tierversuch im Blut am isolierten Katzen- und Hundeherzen nach Aussetzung einer Hypoxie gefunden wurden. Die wahrscheinlichste Theorie ist die, daß intrazelluläres ATP während der myokardialen Hypoxie zu Adenosin abgebaut wird, das seinerseits durch das Sarkolemm hindurchtritt und die Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße bewirkt.

Eine neue Erkenntnis erlangte man in den frühen 60-er Jahren durch die Entdeckung einer weder adrenergen noch cholenergen Komponente im autonomen Nervensystem (Burnstock, 1969, S.247). Diese nicht adrenergen, nicht cholinergen Nerven sind gehäuft im Gastrointestinaltrakt vertreten, kommen aber daneben noch in vielen anderen Organen wie Lunge, Harnblase, Uterus und Samenblase vor. Burnstock war der Erste, der behauptete die Substanz, die von den nicht adrenergen, nicht cholinergen Nerven freigesetzt werde, sei ATP, ein Purinnukleotid und nannte deshalb diese Nerven purinerg (Burnstock, 1971, S.282,283).

1969 erkannte man, daß Adenosin und AMP eine Anhäufung von c-AMP bewirken (Shimizu, et al, 1969, S.1617).

Der nächste Schritt bestand in der Erforschung von präsynaptischen Purinrezeptoren an der Skelettmuskulatur. Untersuchungen ergaben, daß Adenosine und Adenosinnukleotide einerseits die spontane und die induzierte Freisetzung von Acetylcholin aus motorischen Nervenendigungen herabsetzen (Ginsborg et al, 1972, S.629), und andererseits die Noradrealinfreisetzung aus sympathischen Nerven vermindern (Hedqvist et al, 1976,S.221).

1979 schließlich konnte gezeigt werden, daß die präsynaptische Transmitterfreisetzung durch die Hilfe von Adenosinrezeptoren, nicht aber von ATP-Rezeptoren erfolgt (De Mey et al, 1979, S.404).

1978 erfolgte dann durch Burnstock die Einteilung der Purinrezeptoren in zwei große Gruppen (Burnstock, 1978, S.110), die in einem späteren Kapitel dieser Arbeit näher vorgestellt wird.

### **4.3.2. Purinerge Überträgerstoffe, ihre Synthese, Speicherung und Freisetzung**

Für die Beschäftigung mit den Purinrezeptoren ist es zunächst von zentraler Bedeutung sich mit den purinergen Überträgerstoffen zu befassen, die einerseits aus den Adenosinen und andererseits aus ADP und ATP bestehen.

#### **4.3.2.1. ATP als Neurotransmitter**

Vor allem aus nicht-adrenergen-nicht-cholenergen Nervenfasern wird ATP freigesetzt. Auch aus sensorischen, afferenten Nervenfasern kann ATP ausgeschüttet werden (Jahr et al, 1983, S.730; Burnstock et al, 1978, S.145). So konnte man feststellen, daß wenn man den Darm oder die Harnblase des Meerschweinchens einer Nervenstimulation aussetzte es zu einer zwei- bis fünffach stärkerer ATP-Ausschüttung kam als bei einer direkten Muskelstimulation. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß die ATP-Freisetzung im ersteren der beiden Fälle calciumabhängig ist. Falls in den Versuchsreihen Calcium entzogen wird, bemerkt man sofort ein sehr bedeutendes, prozentual weit die Calciumrestriktion übersteigendes Absinken sowohl der ATP-Freisetzung, als auch der Muskelkontraktion. Man konnte auch Beweise dafür erbringen, daß ATP aus Synaptosomen im Darm und Gehirn freigesetzt wird. Zudem wurde ATP mit speziellen Nachweismethoden in Nervenzellen in Darm, Harnblase und Pfortader dargestellt (Hammond et al, 1988, S.371; White, 1988, S.166; Burnstock, 1979, S.377; Crowe et al, 1981, S.106).

ATP wird aus Nervenendigungen freigesetzt und kann dann entweder direkt über postganglionäre  $P_2$ -Rezeptoren wirksam werden, oder zunächst über extrazellulären enzymatischen Abbau zu Adenosin umgewandelt werden, und kann dann über  $P_1$ -Rezeptoren

seine Wirkung entfalten. Auf diese Weise wirkt es auf die Nervenendigungen ein und beeinflusst die Transmitterfreisetzung (De May et al, 1979, S.401). Adenosin wird zusätzlich direkt aus Zellen freigesetzt, die metabolisch aktiv sind oder aktiviert werden (Collis et al, 1993, S.360).

Rezeptorversuche mit ATP werden allerdings dadurch erschwert, daß es an selektiven Antagonisten für  $P_2$ -Rezeptoren mangelt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Apamin, obwohl es kein ATP-Antagonist ist, in niedrigen Konzentrationen über eine Kaliumkanalblockierung eine Antagonisierung des ATP-Effektes zur Folge hat. Daraus kann gefolgert werden, daß die inhibitorische Wirkung von ATP über einen Apamin-sensitiven  $CA^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanal vermittelt wird. Als neuer kompetitiver Hemmstoff für ATP wurde Arylazido-Aminopropionyl-ATP (ANAPP3) beschrieben (Theobald, 1982, S.177; Kasakov et al, 1983, S.293).

Neben der Theorie, daß ATP alleine als Transmitter fungiert, gibt es jedoch auch die Meinung es gäbe ein Nebeneinander von mehreren verschiedenen Überträgersubstanzen. Diese Stoffe können etwa Noradrenalin, Acetylcholin oder unterschiedliche Peptide oder Purinnukleotide sein.

Die gemeinsame Wirkung von ATP und Noradrenalin ist die häufigste Kombination. Es wurde z. B. im vas deferens des Meerschweinchens nachgewiesen, daß ATP als Cotransmitter neben Noradrenalin gespeichert und freigesetzt wird (Sneddon, Westfall, 1984, S.561, 578; Sneddon, Burnstock, 1984, S.88).

Auch in sympathischen Nervenfasern im Bereich der Aorta und der mesenterischen, basilären und pulmonalen Arterien wurde die Rolle von ATP als Cotransmitter nachgewiesen. In chromaffinen Zellen weiß man, daß ATP gemeinsam mit Noradrenalin gespeichert und freigesetzt wird. Für diese Tatsache spricht auch die Beobachtung, daß nach einer Sympathektomie es nicht nur zu einer Hemmung der Noradrenalinfreisetzung, sondern auch der ATP-Freisetzung kommt (Burnstock, 1988, S.116; Burnstock et al, 1984, S.366).

Wenn man einen sympathischen Nerven stimuliert, kommt es zu einer Antwort, die aus zwei verschiedenen Teilen zusammengesetzt ist: einer ersten, phasischen Komponente und einer zweiten, tonischen Komponente. Die erste kann durch ANAPP3 antagonisiert werden, während die zweite durch Prazosin und Reserpin aufgehoben wird. Die Noradrenalinfreisetzung aus adrenergen Nerven kann zudem durch ATP und Adenosin unterbunden werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem präsynaptischen Rezeptor, der dabei im Spiel ist, um einen  $P_1$ -Rezeptor. Dies vermutet man, weil die inhibitorische Wirkung

von ATP und von Adenosin durch Methylxanthine geblockt wird, und weil die langsam abbaubaren Methylenanaloga von ATP unwirksam sind.

Daß Noradrenalin und ATP nebeneinander vorkommen und in ihrer Aufgabe als Neurotransmitter eine synergistische Wirkung ausüben, ist als sicher anzunehmen. Die Frage, die sich stellt ist die, ob die beiden Substanzen an dem gleichen Ort gespeichert werden (Lagercrantz et al, 1982, S.176).

In einer Versuchsreihe konnte besonders deutlich die gegenseitige Beeinflussung der beiden Substanzen gezeigt werden. Noradrenalin hat stark die Antwort der Erfolgsorgane von Vas deferens und Samenblase auf ATP und Adrenalin verändert, und auch umgekehrt zeigte sich eine deutliche Einflußnahme durch Purinnukleotide auf Noradrenalin. Genaugesagt zeigte sich eine Verstärkung der durch Noradrenalin ausgelösten kontraktile Wirkung (Holck et al, 1978, S.116).

Bei der präsynaptischen Einwirkung von mehreren Stoffen kommt es am Vas deferens zu einer ATP- und Noradrenalin ausschüttung. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Calcitonin-gene-related-peptide, Prostaglandin E2 und Angiotensin III (Trachte, 1985, S.57; Trachte, 1988, S.267; Ellis et al, 1989, 97:S.115; Ellis et al, 1989, 98:712).

Ein weiterer Stoff, der in diesem Zusammenhang untersucht wurde, ist Neuropeptid Y. Und zwar agiert Neuropeptid Y, das gemeinsam mit ATP und Noradrenalin in den meisten sympathischen Nerven vorkommt, entweder als präsynaptischer Hemmer der Transmitterfreisetzung, oder als postsynaptischer Verstärker der Noradrenalinwirkung (Potter, 1988, S.271).

Die zweite sehr bedeutende Substanz, mit der ATP gemeinsam wirkt, ist Acetylcholin. Es wurde nachgewiesen, daß in Nervenendigungen die beiden Stoffe gemeinsam vorkommen und auch zusammen freigesetzt werden.

ATP und Adenosin wirken auf präsynaptische purinerge Rezeptoren ein und haben eine Änderung der Menge an freigesetztem Acetylcholin aus cholinergen, motorischen Nerven zur Folge. Diese Wirkung wird wiederum über P<sub>1</sub>-Rezeptoren ausgeübt, was durch die Unterbindung durch Methylxanthine bewiesen werden kann (Richardson et al, 1987, S.628; Kolb et al, 1983, S.621; Hume et al, 1986, S.688; Haggblad et al, 1988, S.135).

Es läßt sich als Schlußfolgerung ableiten, daß aus Nervenendigungen oder Nervenfasern zum Teil calciumabhängig ATP freigesetzt wird und dann über  $P_2$ -Rezeptoren oder aber nach Abbau zu Adenosin über  $P_1$ -Rezeptoren auf die Effektorzellen agiert. Die ATP-Wirkung erfolgt in Kooperation mit anderen Neurotransmittern, wie Noradrenalin, Calcitonin-gene-related-peptide, Prostaglandin E2 und Angiotensin III.

#### **4.3.2.2. Adenosine im Gastrointestinaltrakt**

##### **4.3.2.2.1. Die Purinrezeptoren**

Bei dem Versuch einer Klassifikation der Purinrezeptoren ergibt sich die Schwierigkeit, daß die Ergebnisse der biochemischen nicht immer mit denen von funktionellen Studien in vitro und in vivo übereinstimmen. Durch die Klonierung von Purinrezeptoren konnte zudem gezeigt werden, daß eine noch größere Vielfalt von Rezeptoren existiert, als zunächst mit pharmakologischen oder funktionellen Versuchen vermutet.

##### **4.3.2.2.1.1. Einteilungskriterien**

Die Klassifizierung der Purinrezeptoren wurde lange Zeit durch den Mangel an spezifischen Antagonisten behindert. Es wurden zunächst verschiedene Substanzen mit mehr oder weniger unspezifischer antagonistischer Wirkung verwendet.

So etwa bemerkte man die strukturelle Ähnlichkeit von Theophyllin und den Adenosinabkömmlingen, die eine funktionelle Verwandtschaft nach sich zieht. Dies konnte in mehreren Versuchsreihen bewiesen werden. So zeigte z. B. Okwuasaba et al., daß Theophyllin die Wirkung von Adenosinderivaten nach Nervenstimulation auf die glatte Muskulatur aufhebt (Okwuasaba, et al, 1977, S.195,196). Im Gegensatz dazu berichten Huizinga und Den Hertog, daß Theophyllin die gleiche Wirkung auf die Muskelzellen auslöste wie Adenosinderivate und zwar eine völlige Relaxation dieser Zellen (Huizinga et al, 1980, S. 263). Aber in der gleichen Arbeit zeigen diese Autoren genauso wie Baer und Frew (Baer et al, 1979, S.297), daß obwohl funktioneller Antagonismus besteht, die Hyperpolarisation ausgelöst durch NANC-Überträgerstoffe oder ATP nicht durch Theophyllin geblockt werden kann.

1978 schlug Burnstock die Einteilung der Purinrezeptoren in  $P_1$ - und  $P_2$ - Rezeptoren vor (Burnstock, 1981, S.67,89; Burnstock, 1978, S.110; Burnstock et al, 1983, S. 911). Diese Klassifikation beruht auf einer großen Anzahl von pharmakologischen Studien.

Zunächst erfolgt eine Einteilung aufgrund von nur vier Kriterien:

- 1) die relative Potenz von ATP, ADP, AMP und Adenosin;
- 2) die selektive Wirkung von Antagonisten besonders von Methylxanthinen;
- 3) die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Adenosin, nicht aber durch ATP;
- 4) die Induktion der Prostaglandinsynthese durch ATP, nicht aber durch Adenosin.

Gemäß dieser Definition sind die  $P_1$ -Rezeptoren empfindlicher für Adenosin und AMP als für ATP und ADP. Zudem sind Methylxanthine, wie z. B. Theophyllin oder Coffein für sie selektive kompetitive Antagonisten und bewirken eine Inhibition der Aktivierung des Adenylatzyklasesystems, was seinerseits eine Änderung der Menge des intrazellulären c-AMP zur Folge hat.

Dagegen sind die  $P_2$ -Rezeptoren sensibler für ATP und ADP als für AMP und Adenosin. Die Methylxanthine agieren nicht als Antagonisten auf diese Rezeptoren. Die Wirkung der  $P_2$ -Rezeptoren erfolgt nicht über die Aktivierung eines Adenylatzyklasesystems. Schließlich besteht ein entscheidender Unterschied auch in der Tatsache, daß die Besetzung dieser Rezeptoren eine Steigerung der Prostaglandinsynthese zur Folge hat.

Die Einteilung der Purinrezeptoren hat sich weiterentwickelt. Dabei wurden Stereoselektivitätsstudien für beide Rezeptortypen und die chemischen Gegebenheiten der beiden Purinrezeptoren berücksichtigt. Zudem verfügt man heute über potentere und selektivere Agonisten und Antagonisten für die einzelnen Rezeptortypen. Außerdem ist es wichtig darauf hinzuweisen, daß der extrazelluläre Abbau von ATP sehr schnell erfolgt und deshalb eventuell einige der Wirkungen von ATP und ADP nach Abbau zu AMP und Adenosin über P<sub>1</sub>-Rezeptoren erfolgen (Collis, 1985, 81).

Allerdings fügt man bei der Einteilung der Purinrezeptoren immer mehr Bedeutung der Antagonistenwirkung bei. Agonisten haben bei der Einteilung nur wenig Aussagekraft. Der Grund dafür ist, daß die Wirkpotenz eines Agonisten nicht nur von der Bindungskapazität an den Rezeptor abhängt, sondern auch von der gesamten komplexen Signalübertragung (Bertil et al, 1994, S.145,146).

Die Unterteilung in P<sub>1</sub>- und P<sub>2</sub>- Rezeptoren gilt bis heute weiter, jedoch werden die P<sub>1</sub>-Rezeptoren aufgrund vieler Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet in die Subgruppen A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> unterteilt.

Schließlich ist es besonders wichtig zu beachten, daß die Purinnukleotide sehr schnell durch Enzyme oder Enzymsysteme abgebaut werden können, und daß bei allen Versuchen an die Möglichkeit des zusätzlichen Einflusses von endogenen Liganden gedacht werden muß (Bertil et al, 1994, S.145,146).

#### **4.3.2.2.1.2. P<sub>1</sub>-Rezeptoren**

Adenosinrezeptoren gehören gemäß Stiles et al der Familie der an G-Proteine gekoppelten Rezeptoren an. Derzeit werden zu den P<sub>1</sub>-Rezeptoren gemäß den Regeln des IUPHAR-Komitees vier Untergruppen gezählt: A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>-, A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>- Rezeptoren. Die Kenntnis der Struktur der Aminosäurezusammensetzung führte zur Identifizierung bestimmter Regionen der Rezeptoren, die mit den Liganden interagieren.

Nachfolgend ist in tabellarischer Form die geltende Einteilung der Purinrezeptoren mit den Einteilungskriterien wiedergegeben.

Tab. 18:

Adenosinrezeptoren und ihre Eigenschaften (Tabelle gemäß Fredholm ) (Fredholm, 1996, S.80).

Nomenklatur	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>	A <sub>2B</sub>	A <sub>3</sub>
Selektive Agonisten	CPA CCPA	CGS21680 APEC HE-NECA	-	2-CI-IB-MECA
Selektive Antagonisten	DPCPX	ZM241385 SCH58261 CSC	-	MRS1220 L268605
Radioliganden	[ <sup>3</sup> H]DPCPX [ <sup>3</sup> H]CCPA	[ <sup>3</sup> H]SCH58261 [ <sup>3</sup> H]CGS21680	-	[ <sup>125</sup> I]AB-MECA
G-Protein Effektor	G <sub>i/o</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>i/o</sub>
Gen/Lokalisation auf Chromosom	ADORA1/ 1q32.1	ADORA2A/ 22q11.2	ADORA2B/ 17p11.2-12	ADORA3/ 1p13.3

Die Möglichkeit des Klonens von Adenosinrezeptoren begann mit der Isolierung der c-DNA für RDC7 und RDC8. Inzwischen hat man alle vier Adenosinrezeptor-Subtypen sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen kloniert.

Die Adenosinrezeptoren bestehen aus sieben hydrophoben alpha-Helix-Bereichen, die jeweils aus 22-26 Aminosäuren bestehen, die die Zellmembran durchqueren. Im Vergleich zu anderen G-Protein-bindenden Rezeptoren sind die Adenosinrezeptoren relativ klein (Olah et al, S.582, 583).

Ein wesentliches Merkmal von Purinrezeptoren, das auch zu deren Charakterisierung und Einteilung verwendet wurde, stellt die Desensibilisierung dar.

Die Desensibilisierung ist (Palmer et al, 1994, S.99) das Produkt des Zusammenspiels mehrerer Mechanismen. Die Definition einer Desensibilisierung ist, daß trotz der fortwährenden Präsenz eines Agonisten die durch den Rezeptor ausgelöste Antwort ein Plateau

erreicht und dann abnimmt. Im Falle der G-Protein gekoppelten Rezeptoren findet das meist in Form von einer selektiven Herabsetzung der Signalkapazität des Rezeptorproteins und einer Modulation von anderen Signalübertragungswegen, die die Bildung von second messengers regulieren, statt.

Die Annahme, daß  $P_1$ -Antagonisten an der Steuerung der präsynaptischen Aktivität beteiligt sind, konnte bewiesen werden. So wirken Adenosin und ATP gleichermaßen als präsynaptische Hemmer der Freisetzung von Noradrenalin. Allerdings können keinesfalls ausschließlich  $P_1$ -Rezeptoren beteiligt sein, da der starke  $P_1$ -Antagonist 8-Phenyl-theophyllin kaum die Wirkung von Adenosin antagonisiert (Burnstock et al, 1984, S. 539).

#### **4.3.2.2.1.2.1. $A_1$ -Rezeptoren**

Die  $A_1$ -Rezeptoren wurden bei verschiedenen Species geklont: bei der Ratte, beim Rind, beim Menschen und beim Kaninchen. Bei allen Species mit Ausnahme des Kaninchens besteht der Rezeptor aus 326 Aminosäuren. Antagonist-Radioliganden werden mit einer hohen Affinität an die  $A_1$ -Rezeptoren gebunden ( $K_d = 1\text{nM}$ ). Agonisten werden in folgender abfallenden Potenz der Bindungskapazität gebunden: (-)- $N^6$ -(R-phenylisopropyl)adenosine (R-PIA) > 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) > (+)- $N^6$ -phenylisopropyladenosine (S-PIA).

Die mRNA der Ratte wurde mit Hilfe von Northern Blotting und in situ Hybridisierung untersucht, wobei sich zeigte, daß die  $A_1$ -Rezeptoren häufig im Gehirn vorkommen, hier besonders gehäuft im Bereich des Cortex, Kleinhirn, Thalamus und Hippocampus. Daneben waren sie noch in großer Zahl nachweisbar im Rückenmark, Fettgewebe und in den Hoden. Auch im Bereich des Herzens und der Milz waren bei Ratte und Rind  $A_1$ -Rezeptoren vorhanden.

Beim Menschen besteht das  $A_1$ -Rezeptor-Gen aus mindestens sechs Exons und fünf Introns. Die unterschiedliche Anordnung dieser Introns und Exons wurde bereits genau untersucht und beschrieben (Olah et al, 1995, S.584, 585).

Die  $A_1$ -Rezeptoren sind klassischerweise mit der Inhibierung der Adenylatcyclase vergesellschaftet, was auch zur Charakterisierung der geklonten  $A_1$ -Rezeptoren verwendet wurde. Zudem besteht in vielen Fällen eine Koppelung der  $A_1$ -Rezeptoren zu einer Aktivierung der Phospholipase C, was zu einer Erhöhung der Inositol-Phosphat-Konzentration und damit des intrazellulären Calciums führt.

Normalerweise führt die Stimulation von  $A_1$ -Rezeptoren im Bereich der Gefäße zu einer Vasodilatation. Eine Ausnahme bilden hier nur die renalen Blutgefäße des Kaninchens, wo es paradoxerweise zu einer Vasokonstriktion kommt.

#### **4.3.2.2.1.2.2. $A_{2A}$ -Rezeptoren**

Die  $A_{2A}$ -Rezeptoren wurden bisher bei Ratte, Hund und Mensch kloniert. Die  $A_{2A}$ -Rezeptoren sind größere Proteine als die anderen Adenosinrezeptor-Subtypen. Diese Rezeptoren bestehen aus 410-412 Aminosäuren. Die zusätzliche Größe der  $A_{2A}$ -Rezeptoren kommt durch das Carboxy-terminale Ende des Moleküls zustande. Die Funktion dieses schwanzförmigen Gebildes konnte noch nicht letztendlich geklärt werden. Eventuell könnte eine Bedeutung in der Häufung von Serin- und Threonin- Aminosäuren in dieser Region liegen (Olah et al, 1995, S.584, 585). Dadurch könnte es sich um eine Phosphorylierungsstelle des Moleküls handeln, die so bei der Desensibilisierung des Rezeptors beteiligt wäre.

Pharmakologisch kann man die  $A_{2A}$ -Rezeptoren durch ihre hohe Affinität für die Radioliganden [ $^3$ H]CGS21680 und [ $^{125}$ I]-2-[4-[2-[2-[phenylmethylcarbonylamino]ethylaminocarbonyl]ethyl]phenyl]ethylamino-5'-N-ethyl-carboxamidoadenosine ([ $^{125}$ I]-PAPA-APEC) definieren. Durch die Bindungsfähigkeit zu diesen beiden Radioliganden werden  $A_{2A}$ - und  $A_{2B}$ - Rezeptoren unterschieden. Die Potenz-Reihenfolge der Adenosinantagonisten an  $A_{2A}$ -Rezeptoren ist NECA > R-PIA > S-PIA. Es gibt Antagonisten (Olah et al, 1995, S.584, 585), die eine hohe Affinität an  $A_1$ -Rezeptoren haben und eine relativ niedrige an  $A_{2A}$ -Rezeptoren. Der umgekehrte Fall konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den anderen Adenosinrezeptoren, die besonders gehäuft im Bereich des Gehirns vorkommen, konnte mit Hilfe des Northern Blots nachgewiesen werden, daß hier  $A_{2A}$ -Rezeptoren eher selten sind. Im Bereich des Gehirns findet man die  $A_{2A}$ -Rezeptoren am häufigsten im Gebiet des Striatum, wesentlich seltener im Cortex oder im Mittelhirn und überhaupt nicht im Kleinhirn und im Hypothalamus. Durch in situ Hybridisierung konnte gezeigt werden, daß es ein gemeinsames Vorkommen von  $A_{2A}$ -Rezeptoren und  $D_2$ -Dopaminrezeptor-mRNA und Enkephalin-m-RNA im Bereich von striatalen Neuronen gibt.  $A_{2A}$ -Rezeptoren findet man zudem im Herzen, Milz, Lunge, Leber und auf Thrombozyten.

Die Wirkung von  $A_{2A}$ -Rezeptoren wird über eine Aktivierung der Adenylatcyclase über  $G_s$  vermittelt (Olah et al, 1995, S.584, 586).

#### **4.3.2.2.1.2.3. $A_{2B}$ -Rezeptoren**

Die Unterteilung der  $A_2$ -Rezeptoren in  $A_{2A}$ -Rezeptoren und  $A_{2B}$ -Rezeptoren erfolgte aufgrund einer unterschiedlichen Bindungskapazität an Antagonisten, sowie einer unterschiedlichen Verteilung auf die verschiedenen Organe des Organismus. z.B. kommen im Bereich des Gehirns im Striatum  $A_{2A}$ -Rezeptoren vor, während in den anderen Bereichen des Gehirns  $A_{2B}$ -Rezeptoren zu finden sind (Olah et al, 1995, S.584, 585). Der  $A_{2B}$ -Rezeptor wurde aus dem Gehirn der Ratte und des Menschen geklont.

$A_{2B}$ -Rezeptoren bestehen aus etwa 80 Aminosäuren weniger als die  $A_{2A}$ -Rezeptoren und entsprechen in ihrer Größe etwa den  $A_1$ - und den  $A_3$ -Rezeptoren.

Das Problem bei den  $A_{2B}$ -Rezeptoren ist der Mangel an Liganden, die spezifisch an diese Rezeptoren binden. Die Affinität an [ $^3$ H]NECA ist gering und an [ $^3$ H]CGS21680 oder [ $^{125}$ I]-PAPA-APEC binden  $A_{2B}$ -Rezeptoren nicht. Die Unterscheidung zu den  $A_{2A}$ -Rezeptoren erfolgte aufgrund der fehlenden Bindungskapazität zu [ $^3$ H]CGS21680 und [ $^{125}$ I]-PAPA-APEC und durch ihre Fähigkeit eine Theophyllin-empfindliche, NECA-induzierte Stimulierung der Adenylatcyclase auszulösen. Manche Xanthinantagonisten haben zudem eine höhere Affinität zu  $A_{2B}$ -Rezeptoren als zu  $A_{2A}$ -Rezeptoren.

Mit Northern Blot-Versuchen an Ratten konnte festgestellt werden, daß die  $A_{2B}$ -Rezeptoren am häufigsten im Caecum, Colon, Harnblase, Gehirn, Rückenmark und Lunge vorkommen.

Es erscheint wahrscheinlich, daß die Aktivierung von  $A_{2B}$ -Rezeptoren eine Stimulierung der Phospholipase C auslöst. Diese Vermutung konnte jedoch erst in einer Versuchsreihe nachgewiesen werden. Es wurde beschrieben, daß  $A_{2B}$ -Rezeptoren auf basophilen Leukämiezellreihen bei der Ratte vorkommen, den sogenannten RBL-2H3. Zudem ist beschrieben, daß  $A_{2B}$ -Rezeptoren die Aktivität von Calcium Kanälen bei Oocyten stimulieren. Aus diesen Gründen wurde postuliert daß die  $A_{2B}$ -Rezeptoren die sekretorische Wirkung von Adenosinen auf Mastzellen steuern.

#### **4.3.2.2.1.2.4. $A_3$ -Rezeptoren**

Die Entdeckung der  $A_3$ -Rezeptoren erfolgte zufällig im Rahmen von Klonierungsversuchen. Die Erstbeschreibung gelang (Olah et al, 1995, S.584, 585) am Rattenhoden 1991, gefolgt von der Isolierung im Rattengehirn. Die pharmakologischen Eigenschaften des neuen Adenosinrezeptors entsprachen nicht den  $A_1$ - oder den  $A_2$ -Rezeptoren. Die Bindungsaffinität der Agonisten war folgende:  $N^6$ -2-(4-amino-3-[ $^{125}$ I]iodophenyl)-ethyladenosine ([ $^{125}$ I]-APNEA), ein sehr potenter Agonist an  $A_1$ -Rezeptoren war auch an  $A_3$ -Rezeptoren ein potenter Agonist. Gefolgt wurde die Liste der Agonisten von R-PIA = NECA > S-PIA. Als der potenteste, jedoch nicht selektive Radioligand für die  $A_3$ -Rezeptoren wurde das Molekül  $N^6$ -(3-[ $^{125}$ I]iodo-4-aminobenzyl<9-5'-N-methylcarboxamidoadenosine ([ $^{125}$ I]-AB-MECA) entwickelt. Insgesamt ist die Affinität dieser Agonisten deutlich niedriger, als bei den  $A_1$ -Rezeptoren. Xanthinderivate binden kaum an die  $A_3$ -Rezeptoren. In allen Fällen binden sie stets mit einer niedrigeren Affinität als an  $A_1$ -Rezeptoren.

Inzwischen sind auch  $A_3$ -Rezeptoren bei Schafen und beim Menschen geklont worden.

Die  $A_3$ -Rezeptoren bestehen aus 317-320 Aminosäuren. Ihre Größe entspricht damit in etwa der der  $A_1$ -Rezeptoren.

Die Verteilung der  $A_3$ -Rezeptoren auf die verschiedenen Organsystem ist artspezifisch. Bei der Ratte findet man die höchste Konzentration an  $A_3$ -Rezeptoren im Hodengewebe. Seltener findet man die  $A_3$ -Rezeptoren in Lunge, Milz und Herz bei der Ratte. Noch geringer ist das Vorkommen im Gehirn dieses Species. Beim Menschen ist die Häufigkeit des Vorkommens wie folgt: Lunge/Leber > Gehirn/Aorta > Hoden > Herz.

Da in allen Species  $A_3$ -Rezeptoren besonders gehäuft in der Lunge vorkommen, geht man davon aus, daß sie bei der Auslösung von allergischen Reaktionen der Lunge eine Rolle spielen könnten. Zudem wirken Adenosine auf Mastzellen über  $A_3$ -Rezeptoren. Bei der Ratte konnte bei einer Zugabe von APNEA, R-PIA und NECA eine über  $A_3$ -Rezeptoren ausgelöste hypotensive Reaktion beobachtet werden. Der Nachweis einer Aktion über  $A_3$ -Rezeptoren gelang, da der Antagonist 8-sulphophenyltheophyllin, der die über  $A_1$ -Rezeptoren ausgelöste Bradykardie und die über  $A_{2A}$ -Rezeptoren ausgelöste Hypotension antagonisiert hier keine Wirkung zeigte. Auch beim Menschen konnte eine eine Hypotension auslösende Wirkung von  $A_3$ -Rezeptoren festgestellt werden. Dieser Effekt war sensitiv auf Pertussis Toxin (Olah et al, 1995, S.584, 585).

Die Aktivierung der  $A_3$ -Rezeptoren bewirkt eine Erhöhung der zellulären Inositol-phosphat-Konzentration und der Konzentration des intrazellulären Calciums.

#### **4.3.2.2.1.3. $P_2$ -Rezeptoren**

Bei der Untersuchung der Wirkung von ATP in verschiedenen biologischen Systemen wurde eine Untergruppe der  $P_2$ -Rezeptoren postuliert (Fredholm et al, 1994, S.152). Zunächst seien von Burnstock et al die beiden Hauptgruppen  $P_{2X}$ -Rezeptoren und  $P_{2Y}$ -Rezeptoren benannt worden. Die beiden  $P_2$ -Rezeptoren wurden aufgrund folgender Antwort-Charakteristika auf eine Anzahl von ATP-Analoga eingeteilt:

alpha,beta-MeATP > beta,gamma-MeATP > ATP = 2-MeSATP = ADP beim  $P_{2X}$ -Rezeptor-Subtypen und 2-MeSATP > ATP >> alpha,beta-MeATP = beta,gamma-MeATP beim  $P_{2Y}$ -Rezeptor-Subtypen. Besonders nützlich zur Unterscheidung der beiden Subgruppen

sind 2-MeSATP, alpha,beta-MeATP und L-beta,gamma-MeATP. Zudem sind  $P_{2X}$ -Rezeptoren leicht durch alpha,beta-MeATP zu desensibilisieren.

In neueren Versuchen hat sich gezeigt (Fredholm et al, 1994, S.152), daß die Gruppe der  $P_{2X}$ -Rezeptoren aus einem intrinsischen Ionen-Kanal besteht, der permeabel ist für  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$ .  $P_{2Y}$ -Rezeptoren dagegen sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die oft an die Stimulierung der Phospholipase und damit an die Bildung von Inositoltriphosphat gebunden sind. Jedoch sind für diesen Rezeptorsubtypen auch andere Übertragungsmechanismen, wie die Bildung von zyklischem AMP oder die Mobilisierung von Arachidonsäure nachgewiesen worden.

Später sind die  $P_2$ -Rezeptoren von Gordon 1986 in weitere Subgruppen unterteilt worden. Hinzu kamen die  $P_{2T}$ -Rezeptoren und die  $P_{2Z}$ -Rezeptoren. Die ersteren befinden sich auf Thrombozyten und sind Rezeptoren für ADP, während die letzteren  $ATP^{4-}$ -Antworten vermitteln und auf Mastzellen und Makrophagen zu finden sind. Sie scheinen die Öffnung von relativ unselektiven Poren zu vermitteln.

Auch gibt es jetzt Nachweise dafür, daß es eine Sorte von  $P_2$ -Rezeptoren gibt, die auf UTP, ATP und  $ATPyS$  reagieren, jedoch nicht auf 2-MeSATP oder alpha,beta-MeATP. Diese  $P_2$ -Rezeptoren wurden  $P_{2U}$ -Rezeptoren bzw. Nucleotid- oder Pyrimidin- Rezeptoren genannt.

Eine große Schwierigkeit stellt der Mangel an für  $P_2$ -Rezeptoren selektiven Antagonisten dar. Suramin verhält sich in vielen Fällen wie ein selektiver Antagonist, jedoch ist es nicht möglich mit Hilfe dieses Antagonisten zwischen  $P_{2X}$ -Rezeptoren und  $P_{2Y}$ -Rezeptoren zu unterscheiden. Pyridoxalphosphat wurde als an  $P_{2X}$ -Rezeptoren wirkender Antagonist gefunden. Die Substanz Reactive blue wurde als an  $P_{2Y}$ -Rezeptoren als Antagonist agierendes Reagenz beschrieben. Diese letztgenannte Substanz ist ein Anthrachinon-Schwefelsäure-Derivat und wirkt nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich als spezifischer Antagonist (Manzini et al, 1986, S.200; Burnstock et al, 1987, S.390; Housten et al, 1987, S.503).

Als selektive Antagonisten wurden inzwischen für die  $P_{2X}$ -Rezeptoren Arylazidoaminopropylprionyl ATP (ANAPP3) und 5'-( $\beta,\gamma$ -methylen)-triphosphat postuliert (Cusack et al, 1987, S.794)

Auch  $P_{2Y}$ -Rezeptoren und  $P_{2U}$ -Rezeptoren wurden in den letzten Jahren geklont.

Inzwischen hat man auch Einzelheiten über den molekularen Aufbau von  $P_2$ -Rezeptoren herausgefunden. Untersucht wurde die Struktur dieser Rezeptoren an *Xenopus* Oozyten,

denen mRNA aus dem Gehirn von Meerschweinchen Embryonen injiziert wurde. Ebenfalls als Untersuchungsmaterial dienten das vas deferens des Meerschweinchens und Promyelozyten-Leukämie-Zellen. All diese Rezeptoren zeigten eine Antwort auf ATP (Fredholm et al, 1994, S.152).

### **Die physiologische Wirkung von ATP auf verschiedene Organsysteme**

In einer sehr großen Zahl von Zellen aus den unterschiedlichsten Organsystemen ist man bei der Suche nach Purinrezeptoren fündig geworden. In manchen Fällen ist man zwar auf die gesuchten Rezeptoren gestoßen, ohne jedoch die physiologische Wirkung herausfinden zu können, aber in den meisten Fällen konnte man auch den Einfluß auf die physiologische Aufgabe des Organs erfassen.

Seitdem die Freisetzung von Adenosin 5'-triphosphat aus isolierten myenterischen Nervenplexus im Dünndarm des Meerschweinchens nachgewiesen wurde, werden die endogenen Purine als wichtiger Faktor bei der Regulation des enterischen Reflexes diskutiert (White et al, 1982, S.207).

ATP hat über seine Wirkung auf  $P_2$ -Rezeptoren in vielen physiologischen Abläufen eine wichtige Rolle. Nachfolgend sollen einige seiner physiologischen Aufgaben dargestellt werden.

Im Bereich des Gastrointestinaltraktes erfolgt die purinerge Steuerung durch ATP an vielen Angriffspunkten.

Die Sekretion der Glandula parotis wird über  $P_{2y}$ -Rezeptoren reguliert, sodaß bereits zu Beginn des Verdauungsweges ATP involviert ist (Soltoff et al, 1992, S.C938).

$P_2$ -Purinrezeptoren lenken den Ionentransport der Epithelzellen des Darmtraktes, indem mit ihrer Hilfe ATP den Chlortransport begünstigt und die Calciumverteilung einschränkt (Gil-Rodrigo et al, 1990, S.103). ATP bzw. sein stabiles Analogon  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP, ein  $P_{2y}$ -Rezeptor-Agonist, zeigen in den Versuchen dieser Arbeit den inhibitorischen Einfluß von exogenem ATP auf den ascendierenden Reflex. Dagegen verstärkte der  $P_{2y}$ -Rezeptor-Antagonist reactive blue die myenterische Reflexantwort. Aus der Zusammenschau dieser Arbeiten läßt sich folgern, daß exogenes sowie auch endogenes ATP insgesamt eine Hemmung des ascendierenden Reflexes also der Motilität des Ileum bewirken.

ATP hat im Leberstoffwechsel eine glykogenolytische Wirkung. So kommt es in Versuchen mit Einwirkung von ATP auf Leberzellen zu einer meßbaren Zunahme der Hyperpolarisation der Hepatocyten. Die Glykogenolyse erfolgt sehr wahrscheinlich über einen Mechanismus, in den  $P_{2y}$ -Rezeptoren involviert sind. Auch Adenosin wirkt stimulierend auf die Glykogenolyse ein, jedoch erfolgt dies auf indirektem Weg über  $A_2$ -Rezeptoren (Gil-Rodrigo et al, 1990, S.103).

Schließlich sei die regulatorische Wirkung von ATP auf endokrine Abläufe am Beispiel der Bauchspeicheldrüse gezeigt. Die pankreatischen B-Zellen können über  $P_{2y}$ -Rezeptoren stimuliert werden, was naturgemäß zu einer Insulinsekretion führt. Die  $A$ -Zellen, die Glukagon freisetzen können, werden mit Hilfe von Adenosin über  $A_2$ -Rezeptoren gelenkt (Loubatières-Mariani et al, 1988, S.119).

Als nächstes folgen einige Beispiele für die wichtige Rolle von ATP auf die Niere. ATP wirkt direkt auf die Mesangialzellen und auf epitheloide MDCK-Zellen der Niere ein. Daneben kommt ATP als Co-Transmitter die Aufgabe zu den Elektrolyttransfer der Nierentubuli zu steuern. Auch für die Regulierung des Ionentransportes der Nierenepithelzellen sind die  $P_2$ -Purinrezeptoren zuständig (Paulmichl et al, 1991, S.68).

Im Bereich des Respirationstraktes kommt es unter anderem zu einer Wirkung von ATP auf die Alveolarzellen. Die Sekretion von Surfactant factor aus Typ II-Alveolarzellen wird aller Wahrscheinlichkeit nach einer Regulation von über  $P_{2y}$ -Rezeptoren wirkendem ATP unterzogen (Griese et al, 1991, S.L144).

In der hämatologische Forschung wurde ebenfalls die wichtige Rolle von  $P_2$ -Rezeptoren aufgezeigt. Auf Erythrozyten konnten in Versuchen  $P_{2y}$ -Purinrezeptoren nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Rezeptoren von Thrombozyten um  $P_{2t}$ -Rezeptoren. Zu dieser Erkenntnis gelangte man dadurch, daß man nachweisen konnte, daß es hier in viel größerem Maße durch ADP als durch ATP zu einer Aktivierung der Thrombozytenaggregation kommt. Die Einwirkung von ADP führt zu einer rapiden Veränderung der Thrombozytenform und dies wiederum hat die Aggregation der Blutplättchen zur Folge. Die Inhibierung der Thrombozytenaggregation allerdings wird über  $P_1$ -Purinrezeptoren gesteuert (Hourani et al, 1991, S.243).

Der Effekt von ATP auf endotheliale Zellen im Bereich der Wände von Blutgefäßen besteht in der Freisetzung von Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) und einer darauffolgenden Vasodilatation. Die Rezeptoren, über die ATP auf die Gefäßwand einwirken kann sind  $P_{2y}$ -

Rezeptoren (Natori et al, 1992, S.120). So muß man davon ausgehen, daß im Bereich des Ileum es neben der Hemmung des ascendierenden Reflexes zu einer gleichzeitigen Vasodilatation kommt.

In verschiedenartigen Versuchsaufbauten wurde in unterschiedlichsten endokrinen Organen der Einfluß von ATP nachgewiesen. Der Beweis für das Vorliegen von ATP-Rezeptoren konnte in Zellen der Schilddrüse, in Thymuszellen, adrenalen medullären chromaffinen Zellen und im pathologischen Fall in Zellen eines Phäochromozytoms bzw. eines Neuroblastoms geführt werden (Sato et al, 1992, S.281).

In Spermatozyten, Fettzellen und Astrozyten ist man ebenso auf Purinozeptoren gestoßen wie z.B. in Osteoblasten. Im Bereich der kochlearen Haarzellen kommt es nach Einwirkung von ATP in extrem niedriger Dosierung zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Auf Fibroblasten hat ATP einen sehr ähnlichen Effekt, nämlich die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration und hiermit eine Kontrolle der Funktion (Fine Jet al, 1989, S.371).

Insgesamt kann man eine wichtige physiologische Rolle von ATP in vielen verschiedenen Organsystemen feststellen. Häufig erfolgt die Beeinflussung durch ATP durch Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration.

#### **4.3.2.2.1.4. Verteilung der Purinrezeptoren**

Neben der Einteilung gemäß ihrer Art und Wirkungsweise ist besonders auch die Verteilung der Purinrezeptoren im Organismus von Bedeutung.

### **P<sub>1</sub>-Rezeptoren**

Purinorezeptoren sind in vielen glatten Muskeln vertreten. Man hat sie z.B. im Herzmuskel von Wirbeltieren oder in den Nervenzellen des Gehirns identifiziert. Auch im Bereich der Blutgerinnung nehmen sie eine wichtige Stellung ein, da über die  $P_1$ -Rezeptoraktivierung eine Inhibition der Thrombozytenaggregation erzielt wird (Burnstock, 1980, S.179; Kakei et al, 1984, S.280; Williams, 1987, S.289).

Es folgt eine Zusammenstellung der  $P_1$ -Rezeptoren im Einzelnen mit Schwerpunkt auf ihrem Vorkommen in den verschiedenen Organsystemen.

### 1) $A_1$ -Rezeptoren

Es ist wichtig zu wissen, daß man auch im Bereich von Nerven und Astrozyten Purinrezeptoren findet. Auf diesem Gebiet agiert Adenosin über präsynaptische  $P_1$ -Rezeptoren, meist vom Typ  $A_1$ . Auf diese Weise kann es die Freisetzung von Transmittern aus den Nervenendigungen von peripheren adrenergen und cholinergen Nerven steuern (Burnstock, 1986, S.200).

Auch in Astrozyten entdeckte man neben  $P_2$ -Rezeptoren auch  $P_1$ -Rezeptoren (Gebicke-Haerter et al, 1988, S.706; Pearce, et al, 1989, S.975).

Auf dem Gebiet des zentralen Nervensystems sind folgende Effekte zu vermerken: durch  $A_1$ -Rezeptoren werden ein antikonvulsiver Einfluß, eine Sedation und eine Abnahme der Transmitterfreisetzung gesteuert.

Die neutrophile Chemotaxis bildet eine Ausnahme im immunologischen Bereich durch eine Steuerung über  $A_1$ -Rezeptoren.

Im Gefäßsystem beobachtet man eine Vasokonstriktion bei einer Innervation von  $A_1$ -Rezeptoren, die gleichzeitig auch eine Bradycardie zur Folge haben kann. Ferner wird über den selben Rezeptor auch eine negativ inotrope und negativ dromotrope Wirkung ausgelöst (Needham et al, 1987, S.200; Sauve et al, 1988, S.480; Pearson et al, 1990, S.580).

Bei Untersuchungen der Niere in Bezug auf Adenosinrezeptoren stellt man fest, daß sich hier hauptsächlich  $A_1$ -Rezeptoren befinden. So werden alle folgenden Effekte über  $A_1$ -Stimulation

hervorgerufen: Antidiurese, Abnahme der Reninausschüttung, Verkleinerung der glomerulären Filtration und Zellkontraktion im Bereich des Mesangiums.

Im Respirationstrakt wird die Bronchokonstriktion über  $A_1$ -Rezeptoren gesteuert

Die metabolischen Effekte, die über  $A_1$ -Rezeptoren gesteuert werden sind folgende:  
Inhibierung der Lipolyse und Abnahme der Insulinempfindlichkeit.

## 2) $A_2$ -Rezeptoren

In glatten Muskelzellen, sowohl in Gefäßmuskeln, wie auch in visceralen Muskeln trifft man hauptsächlich und in großer Zahl auf  $P_1$ -Rezeptoren, und zwar insbesondere auf  $A_2$ -Rezeptoren.

Eine  $A_2$ -Rezeptoren-Aktivierung bewirkt im zentralen Nervensystem die Stimulation der Chemorezeptoren und über  $A_{2A}$ -Rezeptoren die Abnahme der lokomotorischen Aktivität.

Die Zellen des Immunsystems, wie auch die Mastzellen verfügen ebenfalls über ein Netz von Purinrezeptoren. Im Bereich des Abwehrsystems trifft man vor allem auf Rezeptoren vom  $A_2$ -Typ. Beweise wurden vor allem für Adenosinrezeptoren auf Lymphozyten und Granulozyten erbracht (Bonnaffous et al, 1982, S.350).

Über  $A_2$ -Rezeptoren wird ebenfalls eine Immunsuppression gesteuert. Im immunologischen Bereich bildet eine Ausnahme durch eine Steuerung über  $A_1$ -Rezeptoren die neutrophile Chemotaxis.

In der Leber übernimmt Adenosin eine wichtige Funktion. Adenosin ist in der Lage auf die Glykogenolyse einzuwirken, und zwar über  $A_2$ -Rezeptoren (Buxton et al, 1986, S.775).

Im Gefäßsystem sind ebenfalls  $A_2$ -Rezeptoren vorhanden. Die Vasodilatation wird über  $A_{2A}$ -,  $A_{2B}$ - und  $A_3$ -Rezeptoren ausgelöst.

Eine wichtige hämatologische Aufgabe kommt den  $A_2$ -Rezeptoren zu, da sie zur Inhibition der Thrombozyten führen.

Im Respirationstrakt wird die Bronchokonstriktion über  $A_1$ -Rezeptoren gesteuert.

Der metabolische Effekt der Stimulation der Gluconeogenese wird über  $A_2$ -Rezeptoren vermittelt.

### 3) $A_3$ -Rezeptoren

Im Herzmuskel von Wirbeltieren z.B. hat man sowohl  $P_1$ - wie auch  $P_2$ -Rezeptoren identifiziert (Burnstock, 1980, S.176; Kakei et al, 1984, S. 280). Allem Anschein nach gehören die  $P_1$ -Rezeptoren in den Herzmuskelzellen zum Typ der  $A_3$ -Rezeptoren (Ribeiro et al, 1986, S.200; Hoyle et al, 1986, S.287).

Die Vasodilatation wird unter anderem über  $A_3$ -Rezeptoren ausgelöst.

### $P_2$ -Rezeptoren

Im Herzmuskel von Wirbeltieren kommen neben  $P_1$ -Rezeptoren auch  $P_2$ -Rezeptoren vor (Burnstock, 1980, S.176; Kakei et al, 1984, S. 280).

Versuche mit ATP am Rattenherzen, und zwar am Papillarmuskel und an der Kammermuskulatur des rechten Herzens zeigten, daß die Aktivierung von  $P_2$ -Rezeptoren sowohl eine positiv inotrope Wirkung, wie auch den Anstieg des Inositol-Fett-Metabolismus hervorruft.

In manchen Muskeln, wie z.B. im Darm und in der Pfortader des Kaninchens wirkt ATP über  $P_{2Y}$ -Rezeptoren und übt einen stark relaxierenden Effekt aus, während in anderen Muskelgeweben, wie etwa in der Harnblase und im vas deferens und in den meisten Gefäßmuskeln es über  $P_{2X}$ -Rezeptoren zu einer bedeutenden Kontraktion führt.

$P_2$ -Rezeptoren wurden besonders häufig in Zellkörpern von sensorischen Neuronen in Ganglien, im Rückenmark und im Gehirn gefunden. In Astrozyten entdeckte man sowohl  $P_1$ - wie auch  $P_2$ -Rezeptoren (Gebicke-Haerter et al, 1988, S. 706; Pearce et al, 1989, S. 975).

Die calciumabhängige Freisetzung von Histamin aus den Mastzellen ist als wichtiger physiologischer Vorgang zu nennen, der durch die Wirkung von ATP ausgelöst erfolgt, und zwar über einen besonderen Purinrezeptor, den  $P_{2Z}$ -Rezeptor (Gordon, 1986, S.317; Cockcroft et al, 1979, S.240, Tatham et al, 1988, S.19).

Um bei den Zellen des Blutes zu bleiben sind noch die Thrombozyten und die Erythrozyten zu nennen, die über Purinrezeptoren verfügen. Die ersteren werden stärker durch ADP als durch ATP aktiviert, was eine Ausnahme darstellt, und weswegen die auf den Blutplättchen vorhandenen Rezeptoren als  $P_{2T}$ -Rezeptoren benannt wurden (Gordon, 1986, S.317). Durch ADP wird die Plättchenaggregation gesteuert.

ATP wirkt weiterhin auf den Pankreas ein. Und zwar wird über die Stimulierung von  $P_{2Y}$ -Rezeptoren die Insulinfreisetzung gefördert (Loubatieres-Mariani et al, 1988, S.120).

Im Bereich der Leber agiert ATP über  $P_{2Y}$ -Rezeptoren und übt so eine glykogenolytische Wirkung durch eine Hyperpolarisation der Hepatozyten aus (Häussinger et al, 1987, S.649; Keppens et al, 1986, S.370).

Im Gefäßsystem agiert ATP auf das Gefäßendothelium, wobei es über  $P_{2Y}$ -Rezeptoren eine Vasodilatation herbeiführt (Needham et al, 1987, S.200; Sauve et al, 1988, S.480; Pearson et al, 1990, S.580).

In vielen anderen Organsystemen kommt den Purinrezeptoren eine entscheidende Bedeutung zu. Nachfolgend seien nur einige von diesen aufgeführt. So wird die Magensäuresekretion und die Ausschüttung von Surfactant Factor in den Typ II Alveolarzellen über ATP gelenkt (Rice et al, 1987, S.835; Gilfillan et al, 1988, S.35). Daneben wurden Purinrezeptoren noch in Spermatozyten, Fettzellen, Schilddrüsengewebe, Speicheldrüsenzellen und schließlich auch in Tumorzellen gefunden.

#### 4.3.2.2.1.5. Molekularer Aufbau der Purinrezeptoren und die daraus abgeleitete Wirkungsweise

Allgemein erfolgen in letzter Zeit Rezeptorstudien meist, indem der untersuchte Rezeptor löslich gemacht, gereinigt und angereichert wird oder die entsprechende m-RNA im Ganzen oder fraktioniert in *Xenopus*-Oozyten, die dann den Rezeptor exprimieren, eingespritzt wird. Wie viele andere Rezeptorsysteme gehören die P<sub>1</sub>- und P<sub>2</sub>-Rezeptoren zu den 7-TM (7 "transmembrane part receptors"), d.h. es existieren 7 hydrophobe Abschnitte, die der Verankerung an der Zellmembran dienen (Dascal, 1987, S. 317, 380).

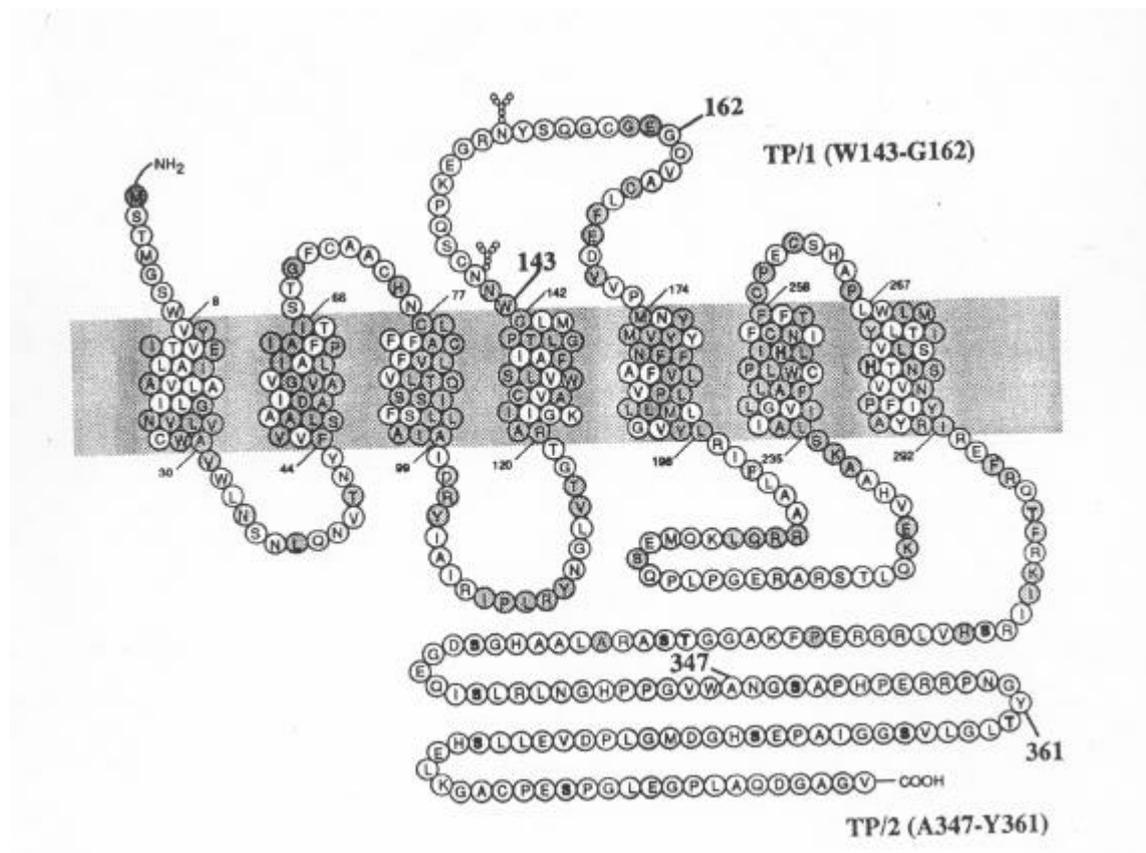


Abb.20:  
Schematische Darstellung eines Adenosinrezeptors

Auf diese Art wurden auch Versuche mit Adenosin und ATP durchgeführt. Es konnte, nachdem die Anreicherung und die Klonierung von sowohl  $A_1$ - als auch  $A_2$ - Rezeptoren gelang, die Struktur von Adenosinrezeptoren in verschiedenen Organsystemen und bei verschiedenen Tierspecies nachgewiesen werden (Van Galen et al, 1992, S.469).

Die Adenosinrezeptoren haben ihr N-terminales Ende außerhalb der Zelle, während das C-terminale Ende sich im Zytoplasma befindet. Der Rezeptor besteht aus sieben transmembranösen Bezirken, die eine alpha-Helix bilden. Sie sind durch kurze intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden.

Es wurden die ersten Versuche zur Identifizierung der Adenosinrezeptoren mit dem  $A_1$ -Rezeptor-Agonisten [ $^{125}$ J]APNEA durchgeführt. Als spezifischen  $A_2$ -Rezeptor-Antagonisten verwendete man [ $^{125}$ J]PAPA-APEC.

Die alpha-Helix Struktur der Rezeptoren bewirkt, daß eine hydrophobe Seite mit der doppelten Phospholipidschicht in Kontakt tritt, während sowohl die hydrophile wie auch die hydrophobe Schicht die internen Poren berühren, wo die Ligandenbindung stattfindet. Eine besonders wichtige Rolle nimmt unter den an den Adenosinrezeptoren beteiligten Aminosäuren das Histidin ein. Die Histidinstellen binden an den N<sup>6</sup>-H-Stellen des Purinringes, sowie am 2'- und 3'- Bereich des Ribose-Anteils. Bei  $A_3$ -Rezeptoren fällt zudem auf, daß Serin an einer mit sonst mit Histidin besetzten Stelle sitzt (Van Galen et al, 1992, S.469). Die extrazellulären Domänen bilden eine Art Tasche, die der Bindung der Liganden dient. Aus diesem Grunde treten wegen der räumlichen Nähe Regionen aller Schleifen mit dem G-Protein in Kontakt, wenn ein Agonist an den Rezeptor bindet.

Die  $A_1$ -Rezeptoren bestehen aus einem 32 kDa schweren Protein. Beim Menschen, Kaninchen und bei der Ratte besteht eine Stelle für die Stickstoff-gebundene Glykolysierung. Diese Stelle findet sich auf der zweiten extrazellulären Schleife.

Der  $A_{2A}$ -Rezeptoren-Agonist [ $^{125}$ J]PAPA-APEC wurde dazu verwendet die  $A_{2A}$ -Rezeptoren zu identifizieren. Der  $A_{2A}$ -Rezeptor ist ein 45kDa schweres Protein. Im Falle der geklonten

A<sub>2A</sub>-Rezeptoren besitzt er zwei Stellen zur Stickstoff-gebundenen Glykolysierung auf der zweiten extrazellulären Schleife.

Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Rezeptoren besitzen die A<sub>3</sub>-Rezeptoren zwei Stellen für die Glykolysierung auf dem N-terminalen Ende, sowie eine Stelle auf der zweiten extrazellulären Schleife.

#### 4.3.2.3. Neue Purinantagonisten

Als eines der bedeutendsten Kriterien zur Bestimmung eines neuen Rezeptors gilt der Nachweis von spezifischen Antagonisten. Hier soll eine Auswahl von in den letzten Jahren entdeckten Purinantagonisten präsentiert werden.

#### A<sub>1</sub>-Rezeptoren

- 1993 untersuchten Howell und Byrd zwei Adenosinantagonisten: **CGS 15943**, einen nicht-Xanthin-Adenosinantagonisten und **Caffein**, einen Xanthin-Adenosinantagonisten. Diese Substanzen verglichen sie mit den bereits bekannten Antagonisten Rolipram, 5'-N-ethylcarboxamidadenosine (nicht-selektiver Adenosinantagonist), N<sub>6</sub>-cyclopenthyladenosine (A<sub>1</sub>-selektiver Adenosinantagonist), N<sub>6</sub>-Cyclohexyladenosine (A<sub>1</sub>-selektiver Adenosinantagonist) und CGS 21680 (A<sub>2</sub>-selektiver Adenosinantagonist). Die Versuche wurden an Eichhörnchen durchgeführt. Hierbei wurde die Wirkung der Stoffe im Gehirn untersucht (Howell et al, 1993, S.432,437).

- In einem Versuchsaufbau am Rattenherzen zeigten Haleen et al, daß der Xanthinderivat **PD 116,948** ein hochselektiver Antagonist an A<sub>1</sub>-Rezeptoren ist. Sie verwendeten den Adenosinagonisten (R)-N-(1-Methyl-2-phenylethyl)adenosine (R-PIA), der negativ chronotrope und negativ vasodilatatorische Wirkung am Herzen ausübt. Diese Wirkungen des R-PIA werden

über  $A_1$ - und  $A_2$ -Rezeptoren vermittelt. Da der  $A_1$ -selektive Antagonist PD 116,948 nur die negativ chronotrope Wirkung des zugegebenen Agonisten aufgehoben hat, muß davon ausgegangen werden, daß Adenosinagonisten ihre negativ chronotrope Effekte über  $A_1$ -Rezeptoren und ihren vasodilatatorischen Einfluß über  $A_2$ -Rezeptoren vermitteln (Haleen et al, 1986, S. 560).

### **$A_2$ -Rezeptoren**

Palmer et al beschrieben 1995 den  $A_2$ -Rezeptor-Antagonisten <sup>125</sup>I-4-2-[7-Amino-2-{2-furyl}{1,2,4}triazolo{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-yl-amino]ethyl)pheno (<sup>125</sup>I-ZM241385). Bis zu diesem Zeitpunkt war kein Antagonist dieses Rezeptors mit einer genügenden Affinität bekannt. Alle vor dieser Substanz isolierten  $A_2$ -Rezeptor-Antagonisten, wie etwa 4-amino-8-chloro-1-phenyl[1,2,4]triazolo[4,-3a]quinoxaline hatten zudem eine zu geringe Sensitivität. Es zeigte sich, daß <sup>125</sup>I-ZM241385 eine 80-fach höhere Affinität zu  $A_{2a}$ -Rezeptoren als zu  $A_{2b}$ -Rezeptoren, eine 500-1000-fach stärkere Affinität im Vergleich zu  $A_1$ -Rezeptoren und 500000-fach stärkere Affinität im Vergleich zu  $A_3$ -Rezeptoren hat. Die Untersuchung des biochemischen Aufbaus zeigte, daß eine besondere Bedeutung bei den phenolischen funktionellen Gruppen lag (Palmer et al, 1995, S.970).

### **$A_3$ -Rezeptoren**

Als letzter der P<sub>1</sub>-Rezeptoren beschrieb man die  $A_3$ -Rezeptoren. In der zitierten Arbeit zeigte sich **N<sup>6</sup>-benzyl-4'-methyladenosine-5'--(N-methyluronamide)** als selektiver  $A_3$ -Rezeptor-Antagonist. Insgesamt zeigte sich bei den chemischen Untersuchungen der Substanzen, daß eine hydrophobe Interaktion in Nähe der Position 2 des Purinringes eine Affinität zum  $A_3$ -Rezeptor bewirkt. Zudem wurde beobachtet, daß das Ersetzen der N<sup>6</sup>-Stelle mit 5'-uronamide-Derivaten die Affinität zum  $A_3$ -Rezeptor erheblich verstärkte (Siddigi et al, 1995, S.1174).

## **P<sub>2</sub>-Rezeptoren**

Lambrecht et al isolierten 1992 einen spezifischen P<sub>2</sub>-purinozeptor-Antagonisten: **PPADS (Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfon-Säure)**. Sie führten ihre Versuche im vas deferens des Kaninchens durch. In diesem System folgt auf eine elektrische Feldstimulation eine biphasische Antwort. Zunächst ist eine phasische und dann sekundär eine tonische Komponente zu beobachten. PPADS bewirkte eine Hemmung der initialen phasischen Komponente, während die sekundäre tonische Komponente durch den alpha1-Antagonisten Prazosin vermindert werden konnte. Zum Organbad wurden exogen verschiedene Metabolite des ATP zugeführt, die eine dosisabhängige Kontraktion des Darmes auslösten. Die von m-ATP ausgelöste Antwort konnte durch PPADS pseudoreversibel blockiert werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß PPADS sowohl pre- als auch postjunktionale die P<sub>2</sub>-Antwort blockiert. Diese Aktion ist selektiv, da alpha1-Adrenozeptoren, muskarinerge M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>- Rezeptoren, H<sub>1</sub>- und A<sub>1</sub>- Rezeptoren von der Substanz nicht gehemmt werden konnten (Lambrecht et al, 1992, S.217).

### **4.3.3. Therapeutische Verwendung der Adenosine**

Die therapeutische Wirkung von Adenosinen, die über P<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird, ist seit längerer Zeit bekannt (Williams, 1993, S.438). Im Gegensatz dazu wurde die klinische Verwendbarkeit der über P<sub>2</sub>-Rezeptoren agierenden Adenosine erst kürzlich erforscht und somit werden entsprechende Substanzen in den klinischen Alltag erst allmählich eingeführt (Abbraccio et al, 1994, S.445). Auch im menschlichen Organismus wurden inzwischen die Effekte der Purine, wie etwa die vasodilatatorische Wirkung über P<sub>1</sub>- und P<sub>2</sub>-Rezeptoren oder die vasokonstriktorische Wirkung über P<sub>2x</sub>-Rezeptoren auf mesenterische Arterien nachgewiesen (Martin et al, 1991, S.645).

Sowohl die Kliniker wie auch die Pharmafirmen zeigen durch die Erforschung der Purinrezeptoren in den unterschiedlichsten Zelltypen zunehmendes Interesse an der klinischen Anwendbarkeit der in dieser Arbeit behandelten Substanzklasse. Es folgt eine Aufzählung möglicher therapeutischer Einsatzgebiete von Adenosin nach Organsystemen geordnet.

Die heutzutage noch am weitesten verbreitete Verwendung von Adenosin zu therapeutischen Zwecken ist die bei der akuten Behandlung der supraventrikulären Tachykardie (Belhassen et al, 1984, S.225). Bei anderen Rhythmusstörungen wird Adenosin zur Therapie ebenfalls verwendet. Im kardiovaskulären Bereich ist weiterhin die antihypertensive Therapie, auch in Extremsituationen wie der Blutdruckkontrolle bei Aneurysmaoperationen, zu nennen (Sollevi et al, 1984, S.400).

Neben dieser etablierten klinischen Indikation gibt es eine Reihe von möglichen Anwendungen, die zur Zeit im Rahmen experimenteller Ansätze überprüft werden.

Adenosin findet Verwendung in der Therapie endokriner Erkrankungen. P<sub>1</sub>-Purinrezeptor-Agonisten wurden zur Behandlung bei Typ I Diabetes mellitus eingesetzt (Loubatières-Mariani M. et al, 1995, S. 525). Im Tierversuch konnte durch Vermittlung von A<sub>2</sub>-Rezeptoren eine schwere, tödlich endende Hyperthyreose ausgelöst werden, sodaß man davon ausgehen muß, daß diese Substanzklasse zur Regulation von hypothyreoten Stoffwechsellagen herangezogen werden kann (Ledent et al, 1992, S.539).

Zerebrale Ischämien bishin zum Apoplex sind eine zusätzliche Indikation für Purine (Jacobsen et al, 1990, S.31). Humphries entdeckte 1994 einen selektiven P<sub>2T</sub>-Antagonisten und entwickelte hieraus ein antithrombotisches Medikament (Humphries et al, 1995, S.179).

Auf dem Gebiet maligner Erkrankungen wird die Fähigkeit von ATP das Tumorwachstum zu bremsen genutzt (Hosoi et al, 1992, S.C635).

Bei entzündlichen Erkrankungen greift man auf die Tatsache zurück, daß die Plasmaextravasation purinerg gesteuert wird (Green et al, 1991, S.4162).

Die Psychiatrie genauso wie die Neurologie profitiert ebenfalls in der Behandlung verschiedener Krankheiten aus dem Fachgebiet. Die ersten Schritte waren die Entdeckung der Interaktion von Adenosinen mit vielen neuroaktiven Stoffen, wie etwa mit Ethanol, Barbituraten, Benzodiazepinen, Opioiden und Carbamazepin. Aus dieser Tatsache wurde die therapeutische Verwendbarkeit der Purine abgeleitet. Als besonders effektiv erweisen sich purinerge Stoffe bei neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen die pathologische exzitatorische Wirkung von Glutamat eine ausschlaggebende Rolle spielt, wie etwa bei M. Parkinson,

bei M. Alzheimer, bei der amyotrophen Lateralsklerose und bei der Chorea Huntington . Auch wurden bereits Epileptiker erfolgreich behandelt.

In der Psychiatrie werden Therapieversuche unternommen bei Depressionen, Schizophrenien und Angstsyndromen (Daval et al, 1991, S.1435).

Bisher wurden in diesen Bereichen hauptsächlich P<sub>1</sub>-purinerge Substanzen verwandt. Jedoch ist zu erwarten, daß da man ATP als einen zentralen Neurotransmitter immer mehr anerkennt, es zur zunehmenden Anwendung von P<sub>2</sub>-purinergenn Stoffen kommen wird.

Folgende Aufzählung therapeutischer Einsatzmöglichkeiten spiegelt das Ausmaß der Bedeutung dieser Stoffgruppe wieder: pulmonale Hypertension, Harninkontinenz, im gynäkologischen Bereich die Kontrazeption und die Sterilitätsbehandlung, auf chirurgischem Gebiet die Wundheilungsstörungen und die Ischämien und in unserem Zusammenhang besonders wichtig die Behandlung der Diarrhoe und der Obstipation.

Daneben kann Adenosin aufgrund seiner vielfältigen Wirkungsweise theoretisch noch auf so manchen klinischen Gebieten zum Einsatz kommen. A<sub>1</sub>-Antagonisten könnte man bei Nierenerkrankungen, wie etwa bei Nierenversagen verwenden (Kellet et al, 1989, S.1071; Collis et al, 1991, S. 138).

A<sub>2</sub>-Antagonisten könnte man dazu nutzen den Steal-Effekt bei ischämischen Bedingungen aufzuheben und so eine lokale Besserung hervorrufen (Picano et al, 1989, S.15).

Auch beim Schlafapnoe-Syndrom wird die weitere Erforschung der therapeutischen Wirksamkeit von Adenosin vorangetrieben (Wesley et al, 1986, S. 1232; Bednarek et al, 1976, S.336).

## **5. Spezielle Diskussion**

### **5.1. Entwicklung der Erforschung des peristaltischen Reflexes und Merkmale des Reflexmodells**

Die ersten Versuche am peristaltischen Reflex stammen von Bayliss und Starling, die am denervierten Dünndarm des Kaninchens eine Stimulierung durch das Aufpumpen eines intraluminal platzierten Ballons erreichten. Es kam hierbei zu einer Kontraktion der Zirkulärmuskulatur oral und zu einer Relaxation anal, und beim Analwärtsführen des Ballons zu einer Kontraktion hinter dem Ballon und zu einer Relaxation vor dem Ballon. Diese Muskelkontraktionen waren durch neurale Antagonisten blockierbar, sodaß man daraus schließen kann, daß die Aktivierung intrinsischer nervaler Wege zu der Peristaltik führt (Bayliss et al, 1899, S.99).

In der vorliegenden Arbeit geht es ebenfalls zum großen Teil um die intrinsische Innervation und die so ausgelöste Reflexantwort. Es wurden grundsätzliche Ideen des Versuchsaufbaues von Bayliss und Starling übernommen und optimiert.

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Entwicklung der in vitro-Modelle der Darmkontraktion waren die Versuche von Trendelenburg. Er löste in seinem Versuchsaufbau 1917 eine peristaltische Kontraktionswelle am Dünndarm durch eine Erhöhung des intraluminalen Druckes aus (Trendelenburg, 1917, S.55). Die Antwort auf den Stimulationsreiz wurde jedoch anstatt mit einer Druckmeßsonde mittels Volumen- und Längenmessung ermittelt. In seinen Versuchen am Meerschweinchendünndarm beschrieb er bei anwachsender Dehnung der Darmwand zunächst eine Tonusänderung, bis es dann ab einem bestimmten kritischen Punkt zu der Auslösung einer peristaltischen Welle kam. Er spricht von rhythmischer Erschlaffung und Kontraktion der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur, die seiner Meinung nach allerdings nicht gleichzeitig sondern sequentiell erfolgt. Diese Meinung wurde 1998 von Smith et al revidiert (Smith et al, 1998, S.563). Zudem meinte er, die Ringmuskulatur sei ab einem bestimmten Ausmaß der Dehnung tonuslos, sodaß dann die Peristaltik erlischt. Der Darm erhole sich jedoch nach Beendigung der Dehnung wieder. Er beschrieb zudem die Beeinflussbarkeit der Darmperistaltik durch Pharmaka, indem das Erreichen des kritischen Punktes, ab dem Peristaltik erfolgt verschoben werden könne.

In den als Grundlage dieser Arbeit dienenden Versuchen wurde ein Versuchsaufbau verwendet, bei dem ein Ileumsegment aus dem Darm der Ratte in einem Organbad eingespannt ist. Zur Messung des intraluminalen Druckes diente eine in das Darmlumen eingebrachte Druckmeßsonde. Die Kontraktion des Ileumsegmentes wurde über eine elektrische Stimulation durch ein aboral der Meßpunkte des Manometers angebrachtes Platinelektrodenpaar induziert (siehe Kapitel 2.2.1.). Die Messung der erzielten Kontraktionsantwort mit Hilfe einer intraluminal angebrachten Druckmeßsonde wurde gewählt, da sie eine genaue und reproduzierbare Erfassung und pharmakologische Differenzierung des ascendierenden peristaltischen Reflexes erlaubt.

Es wurden bereits die verschiedenen Möglichkeiten aufgeführt, die zur Auslösung des peristaltischen Reflexes am Darmsegment angewendet werden können. Bei der vorliegenden Arbeit fiel die Entscheidung auf die auch von Hukuhara bevorzugte Methode der elektrischen Feldstimulation, bei der sich das Darmstück zwischen den beiden Elektroden befindet (Hukuhara et al, 1958, S.10). Ein Vorteil im Vergleich zur Stimulation Trendelenburgs, der durch intraluminale Flüssigkeitsinstillation eine Druckerhöhung des Darmes bewirkte, ist, daß hierbei eine genau örtlich festlegbare Stimulation erfolgt (Trendelenburg, 1917, S.55; Hukuhara et al, 1958, S.10). Theoretisch wäre im gleichen Versuchsaufbau auch eine Stimulation durch einen intraluminal eingebrachten Ballon möglich, was diesen Vorteil, nämlich die Unterscheidung der beiden Reflexkomponenten erhalten würde, da auch in diesem Fall die Stimulation an einem definierten Ort erfolgt. Nachdem diese Möglichkeit am vorliegenden Modell getestet wurde, kam sie aufgrund der geringeren Reproduzierbarkeit nicht zur Anwendung.

Im Vergleich zu anderen Stimulationsmöglichkeiten eines Darmsegmentes, wie etwa Ballondilatation kommt es bei der elektrischen Stimulation zu nur geringfügiger Zerstörung der Darmschichten, sodaß der physiologische Darmaufbau nicht geschädigt wird.

In den hier vorliegenden Versuchen befinden sich die Meßpunkte der zur Erfassung der Kontraktionsantwort verwendeten Druckmeßsonde oral der elektrischen Elektroden, sodaß ausschließlich der orale Teil, also die aufsteigende exzitatorische Komponente der Reflexantwort, erfaßt wurde. Jedoch zeigt es sich in Kontrollversuchen, bei denen die elektrische Stimulation am oralen Ende erfolgt, daß es hierbei zu keinerlei signifikanten Kontraktionsantwort kommt. Es scheint sich also hierbei um einen spezifischen von aboral nach oral ascendierenden Reflex zu handeln, der die Kontraktionsantwort vermittelt.

Zudem erfolgt bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen eine ständige Oxygenierung der Pufferlösung, in der sich der Darm befindet. Dies ist sehr wichtig um einen limitierenden Effekt der Sauerstoffversorgung zu vermeiden. Frigo und Lecchini konnten in ihren Versuchen aufgrund mangelnder Sauerstoffversorgung nur dünnwandige Darmstücke untersuchen und hatten zudem eine

bedeutend eingeschränkte Zeit zur Untersuchung zur Verfügung (Frigo et al, 1970, S. 348). Im Gegensatz dazu gelingt in den Versuchen der vorliegenden Arbeit durch den oxygenisierten Puffer die Schaffung von physiologischeren Umgebungsbedingungen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen aus dem vorliegenden Aufbau des Reflexmodells ableiten:

- Die mit diesem Versuchsaufbau erzielten Ergebnisse sind gut reproduzierbar und quantifizierbar.
- Die Stimulation kann entweder durch Ballondehnung oder durch elektrische Feldstimulation erfolgen. Eine Stimulation mit wiederholter Ballondehnung wurde auch an dem vorliegenden Modell getestet. Dabei zeigte sich jedoch, daß die Ballondehnung deutlich weniger reproduzierbar ist, als die Reflexauslösung mittels elektrischer Stimulation. Die Reproduzierbarkeit ist aber gerade für die pharmakologische Untersuchung der Reflexantwort eine entscheidende Voraussetzung.
- Die vorliegenden Versuche wurden am Ileum der Ratte durchgeführt. Es ist jedoch mehrfach beschrieben worden, daß es speziespezifische Unterschiede der Reflexantwort gibt. Bei der Bewertung der Ergebnisse müssen stets die möglichen Abweichungen zwischen den Spezies in Betracht gezogen werden (Holzer, 1989, S.G540; Trendelenburg, 1917, S.55).
- Die elektrische Feldstimulation löst eine rein neurale Reflexantwort aus. Dies konnte durch Versuche bewiesen werden, in denen TTX, ein neuronaler Blocker, die Reflexantwort vollkommen blockierte (Allescher et al, 1992, S.159).

## **5.2. Physiologische Vorgänge während des Ablaufes des exzitatorischen aszendierenden Reflexes nach Stimulation**

### **5.2.1. Der zeitliche Ablauf der Kontraktion des Ileumsegmentes**

Bei der Untersuchung der Kontraktion der Ileummuskulatur stellt sich die Frage welcher Zusammenhang besteht zwischen der Aktion der zirkulären und der der longitudinalen Muskulatur. Die lange bestehende Auffassung über das Verhältnis der beiden Muskelschichten zueinander wurde erst kürzlich revolutioniert.

In in vivo Versuchen von Bayliss und Starling zeigte sich, daß die beiden Muskelschichten sich sequentiell kontrahierten (Bayliss et al, 1899, S.102). In den ebenfalls in vivo durchgeführten Versuchen von Hukuhara, bei denen Filmaufnahmen der Muskelkontraktion studiert wurden, war das Ergebnis identisch (Hukuhara, 1934, S.169). Auch Trendelenburg stellte in seinen Versuchen fest, daß die beiden Muskelschichten hintereinander in Aktion treten. Zunächst zeigte sich die Kontraktion der Longitudinalmuskulatur, der kurz darauf die Kontraktion der Zirkulärmuskulatur folgte (Trendelenburg, 1917, S.55). Die späteren Versuche wurden meist mit abgewandelten Versuchsaufbauten von Trendelenburg durchgeführt und erfolgten in vivo. Die Arbeiten von Bortoff und Ghalib zeigten in die gleiche Richtung wie die von Trendelenburg und deuteten darauf hin, daß die Zirkulär- und die Longitudinalmuskulatur unterschiedlich innerviert werden. Die Zirkulärmuskulatur zeigte während der Kontraktion der Longitudinalmuskulatur eine Inhibierung (Bortoff et al, 1972, S.321).

Smith et al zeigten in ihrer Arbeit 1998, daß die Kontraktion der beiden Muskelschichten anders als bisher angenommen synchron erfolgt. Der peristaltische Reflex entsteht demnach durch die Bildung einer peristaltischen Welle, indem es zu einer synchronen Kontraktion der Longitudinal- und der Zirkulärmuskulatur oral und Relaxation anal des Reizes kommt (Smith et al, 1998, S.564).

### **5.2.2. Biochemische und neurophysiologische Vorgänge während des peristaltischen Reflexes**

Insgesamt besteht der Reflexbogen des peristaltischen Reflexes aus folgenden Komponenten:

- sensorische Neurone mit unterschiedlichen sensorischen Mechanismen
- Interneurone
- motorische Neurone

Es zeigt sich, daß es zwei verschiedene Arten von Reflexen zu geben scheint: der eine wird durch muskuläre Dehnung ausgelöst, der andere durch mukosale Reizung. Bei jeder radialen Dehnung der Darmwand kommt es zu einer Kontraktion der Zirkulärmuskulatur oral des Stimulationsortes und zu einer Relaxation kaudal der Dehnungsstelle (Maggi et al, 1993, S.630).

Es lassen sich zwei Komponenten des peristaltischen Reflexes unterscheiden:

- a) aufsteigender exzitatorischer Reflex
- b) absteigender inhibitorischer Reflex

In der vorliegenden Arbeit wird isoliert die erste Komponente des peristaltischen Reflexes untersucht.

zu a) Der aufsteigende exzitatorische Reflex wird durch cholinerge Neurone gesteuert. Acetylcholin, das über muskarinerge und nikotinerge Rezeptoren agiert, ist eine Überträgersubstanz. Die nach oral laufende Erregung wird über cholinerge Interneurone vermittelt, die ihre Übertragung über nikotinerge, Hexamethonium sensitive Rezeptoren vermitteln. Dies erklärt die von Yokoyama beobachtete Inhibierung durch Atropin (muskarinerg) und Hexamethonium (nikotinerg). Zudem gibt es eine atropinresistente Komponente dieses aufsteigenden Reflexes, die durch Substance P vermittelt wird (Maggi et al, 1993, S.630). Es bleibt unklar, ob diese tachykinergen Neurone einen cholinerg nikotinergen Input erhalten.

zu b) Der absteigende inhibitorische Reflex ist ebenfalls unter anderem über nikotinerge Interneurone vermittelt. Als inhibitorische Neurotransmitter sind NO, VIP/PACAP, ATP und Somatostatin als nicht-adrenerge nicht-cholinerge Übermittlersubstanzen beteiligt. NANC inhibitorische Reflexe können in beinahe allen Bereichen des Säugetierdarmes leicht demonstriert werden. Es konnte in mehreren Fällen gezeigt werden, daß Apamin über die Blockierung von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen die Relaxationsantwort des Darmes hemmen kann. Es ist möglich, daß mehrere verschiedene Transmittermechanismen den absteigenden inhibitorischen Reflex vermitteln. In der erwähnten Arbeit wurde festgestellt: es gibt drei verschiedene

Mechanismen, die den absteigenden inhibitorischen Reflex vermitteln. Diese sind erstens ein Apamin-sensitiver, zweitens ein L-NOARG (Blocker der NO-Synthase)-sensitiver und drittens ein sowohl Apamin als auch L-NOARG-resistenter (Maggi et al, 1993, S.630).

Einen weiteren Hinweis für die nicht-cholinerge Auslösung des peristaltischen Reflexes im Darm von Mensch, Ratte und Meerschweinchen lieferten Grider et al mit ihren Versuchen 1998. Sie wiesen nach, daß eine Erregung von 5-Hydroxytryptamin-Typ 4-Rezeptoren (5-HT<sub>4</sub>) den peristaltischen Reflex bei den genannten Species triggern. Für ihre Untersuchungen verwendeten sie Darmsegmente, um die Neurotransmitter-Freisetzung und die mechanischen Komponenten des Reflexes zu messen. Es zeigte sich, daß CGRP nur in den Kompartimenten freigesetzt wurde, denen ein 5-HT<sub>4</sub>-Agonist (HTF 919) zugegeben wurde. VIP wurde ausschließlich in den Kompartimenten freigesetzt, wo eine deszendierende Relaxation gemessen werden konnte. Dagegen wurde Substance P nur in den Kompartimenten freigesetzt, in denen eine ascendierende Kontraktion gemessen wurde. Nur der selektive 5-HT<sub>4</sub>-Antagonist, nicht jedoch der 5-HT<sub>3</sub>-Antagonist konnte die Freisetzung von CGRP, VIP und Substance P sowie den ascendierenden und deszendierenden Reflex inhibieren. Aus den Ergebnissen von Grider et al läßt sich ableiten, daß die 5-HT<sub>4</sub>-Agonisten den peristaltischen Reflex beim Menschen, wie auch bei der Ratte und beim Meerschweinchen initiieren (Grider et al, 1998, S.372).

Eine bedeutende Versuchsreihe mit dem Ziel der Untersuchung der elektrischen Aktivität der beiden Muskelschichten während des Kontraktionsvorganges bzw. während der Peristaltik wurde 1980 von Yokoyama et al durchgeführt. Sie untersuchten den Dünndarm des Meerschweinchens in einem Organbad, in dem das Darmsegment horizontal eingespannt war. Die Stimulierung erfolgte durch intraluminale Druckerhöhung (Yokoyama et al, 1980, S.151; Yokoyama et al, 1983, S.G85).

Hexamethonium ( $280 \times 10^{-6} \text{M}$ ) inhibierte die Aktivität der zirkulären, nicht aber der longitudinalen Muskulatur bei Auslösung durch intraluminale Druckerhöhung, änderte jedoch die Spontanaktivität nicht (Yokoyama et al, 1980, S.151). Atropin ( $100 \times 10^{-9} \text{M}$ ) führte zur Schwächung beider Kontraktionskomponenten, unterdrückte sie jedoch nicht ganz. Die atropinresistente Komponente der Erregung der Zirkulärmuskulatur, nicht jedoch der Longitudinalmuskulatur wurde reversibel durch die Zugabe von Substance P blockiert. Daraus kann man schließen, daß die Erregung durch Substance P-Freisetzung bewirkt wird. Die Ursache für die mangelnde Beeinflussung der longitudinalen Komponente durch Substance P könnte daran liegen, daß es nicht an der atropinresistenten Stimulierung dieser Muskelschicht beteiligt ist.

Die atropinresistente Kontraktion der Longitudinalmuskulatur, nicht aber die der Zirkulärmuskulatur konnte durch Substance P ( $100\text{-}500 \times 10^{-9} \text{M}$ ) reversibel blockiert werden. Chymotrypsin (200ug/ml)

hingegen unterdrückte reversibel die atropinresistente exzitatorische Erregung der Zirkulärmuskulatur (Yokoyama et al, 1980, S.151). Yokoyama et al beobachteten zudem, daß falls die Longitudinalmuskelschicht mit dem myenterischen Plexus zu mehr als der Hälfte der Zirkumferenz abgelöst wurde, es zu keiner Antwort des Darmsegmentes auf den Dehnungsreiz kam. Da auch die Zugabe von Tetrodotoxin die gleiche Wirkung zeigt, läßt sich daraus schließen, daß der myenterische Plexus unentbehrlich ist für die beobachtete Muskelkontraktion. Der peristaltische Reflex muß also durch neuronale Mechanismen gesteuert sein.

Insgesamt lassen die Versuche von Yokoyama et al den Schluß zu, daß die Muskelaktivierung während der Peristaltik nicht ausschließlich cholinerg ist, sondern auch Substance P oder ein verwandtes Peptid benötigt.

### **5.2.3. Die Latenzzeit bis zur Auslösung des peristaltischen Reflexes bei elektrischer Feldstimulation**

In den Versuchen der Arbeit von Maggi et al zeigte sich eine Latenzzeit zwischen Stimulation und ersten meßbaren Zeichen der Muskelkontraktion von etwa im Durchschnitt 4 bis 8s. Diese Latenzzeit zeigte keine große Variabilität von Substanz zu Substanz und auch die unterschiedlichen Konzentrationen ein und desselben Stoffes hatten kaum Einfluß darauf. Die in der Literatur zu findenden Angaben entsprechen in etwa den hier gefundenen. Yokoyama findet in seinen Versuchen nach Ballonstimulierung eine Latenzzeit von 1-2 s und auch die Ergebnisse von Kosterlitz et al bewegen sich in diesem Rahmen. Bei Yokoyama konnte eine gewisse Abhängigkeit der Latenzzeit von der Stärke des intraluminalen Druckes durch Ballondehnung festgestellt werden. Die Latenzzeit zwischen Erregung und dem Beginn des Reflexes wurde progressiv geringer bei zunehmender Stärke des intraluminalen Druckes, erreichte jedoch einen Minimalwert, der bei 1-2s lag. Auch in der Arbeit von Kosterlitz et al wird über eine Minimallatenz berichtet, die nicht unterschritten wird. In der vorliegenden Arbeit lag die Latenzzeit in der gleichen Größenordnung wie in den zitierten Arbeiten. Die Latenzzeit kann durch die Verzögerung innerhalb der Nervenplexus erklärt werden und ist abhängig von der Stärke des Stimulationsreizes. Eine Minimallatenz kann durch Erhöhung des Erregungsreizes nicht mehr unterschritten werden (Kosterlitz et al, 1956, S.681; Yokoyama et al, 1980, S.151). Trotzdem unterscheidet sich der vorliegende Versuchsaufbau (elektrische Feldstimulation) von den Versuchsansätzen von Kosterlitz und Yokoyama. Durch die elektrische

Reizung können sowohl inhibitorische wie auch exzitatorische Fasern aktiviert werden, die für die Entstehung der Latenz verantwortlich sind.

#### **5.2.4. Diskussion auffälliger Befunde bei der Auslösung des peristaltischen Reflexes**

Nach einer gewissen Zeit war in Versuchen, bei denen keine Testsubstanz dem Organbad zugesetzt wurde, trotzdem eine Abschwächung der Muskelkontraktionen feststellbar. Diese Minderung der Kontraktionsaktivität war abhängig von der Verweildauer des Präparates im Organbad, trat jedoch erst nach einem gewissen Zeitraum auf.

Dies läßt sich zum einen dadurch erklären, daß das Organ nur in physiologischer Umgebung eine gewisse Zeit *in vitro* überleben kann und die abnehmende kontraktile Aktivität Anzeichen einer nervalen oder muskulären Ermüdung ist.

Zum anderen kann es auch zu einer Verletzung der Darmmuskulatur während der Präparation und zu einer unphysiologischen Reizung im Organbad und während der elektrischen Feldstimulation kommen. Ein weiterer Erklärungsansatz ist der, daß es *in vitro* zu einer gesteigerten Produktion von Prostaglandinen oder anderen inhibitorischen Mediatoren kommt, und hierdurch die Kontraktionsaktivität im Verlauf abnimmt.

Es ist also für die Auswertbarkeit der Ergebnisse bedeutend, daß die Versuchsdauer diese kritische Schwelle, nach der es zu einer Schwächung der gemessenen Aktivität kommt, nicht übersteigt.

Ein anderes Phänomen, das einer Erklärung bedarf ist die Beobachtung von vielen Eigenkontraktionen des Ileumsegmentes während einiger Versuche dieser Arbeit. Dabei handelt es sich um deutlich registrierbare Kontraktionen des Darmes, denen jedoch keine elektrische Stimulation vorausgeht. Diese Aktionen sind Ausdruck einer Spontanaktivität des Darmes, die unter bestimmten Bedingungen besonders stark zu Tage tritt. Eine der die Eigenkontraktionen provozierenden Substanzen war DPCPX.

Ähnliche Spontanaktivität beobachteten auch Yokoyama und Ozaki (Yokoyama et al, 1980, S.151) in ihren Versuchen am Kaninchendünndarm, bei denen sie die Stimulation durch intraluminale

Dehnung erzielen. In Ruhezustand, d.h. ohne Stimulation, stellten sie Salven von rhythmischen Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur fest. Die Salven bestanden jeweils aus zwei bis fünf Aktionspotentialen, die im Intervall von 1 bis 6 Sekunden auftraten. Je länger der Streifen der präparierten Longitudinalmuskulatur war, umso größer war die Anzahl der Eigenkontraktionen. In den entsprechenden Versuchen mit Zirkulärmuskulatur kam es zu keinerlei Eigenkontraktionen. Eine Erklärung für diese Spontanaktivität könnte die Freisetzung von endogenen Substanzen, die zur Auslösung von Aktionspotentialen führen, sein (Yokoyama et al, 1980, S.151).

1998 untersuchten Nahar et al (Nahar et al, 1998, S.150) die Entstehung von Eigenkontraktionen im Colon des Meerschweinchens. Sie konnten zeigen, daß die Zirkulärmuskulatur im Bereich der Grenzzone des Mesenteriums der Flexur regelmäßige Spontankontraktionen macht. Sie konnten bestimmte glatte Muskelzellen isolieren, die sie als Auslöser dieser Spontankontraktionen definieren konnten. Es handelt sich hierbei um bipolare- und unipolare Muskelzellen, die sich in der Nähe der submukösen Schicht befinden, und mit zahlreichen Fortsätzen miteinander verbunden sind. Diese Muskelzellen entsprachen den "Interstitial cells of Cajal" anderer Arbeiten. Sie waren besonders häufig im Bereich der Flexur und des proximalen Colon und entsprechend zeigten sich in diesem Gebiet besonders viele und regelmäßige Eigenkontraktionen (Nahar et al, 1998, S.150).

Zudem ist die intraluminale Dehnung oder Druckerhöhung, wie sie im Trendelenburgschen Modell zur Reflexauslösung verwendet wird ein Stimulus, der zu einer Zunahme der Eigenkontraktionen führt (Trendelenburg, 1917, S.60).

Bei fast allen Versuchen war zu beobachten, daß nach Ausspülen der dem Puffer des Organbades zugesetzten Reagenzien es zu einem Erlöschen der Eigenkontraktionen kam. Der Einfluß dieser Stoffe auf das Darmsegment ist also aufhebbar. Dies läßt sich durch die Annahme erklären, die Bindung der Reagenzien an den entsprechenden Rezeptoren müsse reversibel geschehen. Man kann die Ergebnisse dahingehend interpretieren, daß Adenosine entweder den afferenten Schenkel (sensorische Neurone) oder die Schrittmacherzellen (ICC) entsprechend beeinflusst.

Interessant war zudem die Beobachtung, daß in den Versuchen der vorliegenden Arbeit alle Substanzen an beiden Meßstellen, nämlich 2cm und 4cm vom Stimulationspunkt entfernt, tendentiell die gleiche Wirkung zeigten. Wenn die Wirkung in 2cm Entfernung vom Stimulationsort signifikant war, so war sie das in jedem Fall auch in 4cm Entfernung. Auf der anderen Seite waren die durch

CPA,  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP und reactive blue ausgelösten Wirkungen bei 2cm nicht signifikant, obwohl sie bei 4cm signifikant waren. Die Ursache dafür könnte darin liegen, daß  $P_2$ -Rezeptoren auf Nervenfasern wirken, die länger als 2cm sind. Jedoch ist die Anzahl der Versuche nicht ausreichend, um einen Zufallsbefund mit letzter Sicherheit auszuschließen.

### **5.3. Der Einfluß der untersuchten Substanzen auf den aufsteigenden exzitatorischen Reflex**

Es wurden unterschiedliche Substanzen aus mehreren Stoffgruppen im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Beobachtung der Wirkung von Adenosinagonisten- und antagonistischen auf den aufsteigenden enterischen Reflex. Hier sollen die Ergebnisse in einer Zusammenschau mit den Resultaten verschiedener Arbeitsgruppen verglichen werden.

#### **5.3.1. Apamin**

Apamin ist von seinem Aufbau her ein kleines peptiderges Molekül. In den Positionen 1, 3, 11 und 15 findet man Cysteine. Die Struktur entspricht einer  $\alpha$ -Helix (Remalingam et al, 1993, S.11159).

Bei dieser Substanz handelt es sich um einen hoch selektiven Blocker von calciumabhängigen Kaliumkanälen mit niedriger Leitfähigkeit. Diese Tatsache bewiesen Romer et al mit ihren Versuchen am Ileum der Ratte, wobei sie nachwiesen, daß Apamin in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^{-6} M$  zu einer Blockade von calciumabhängigen Kaliumkanälen führt (Romer et al, 1993, S.327). Auch in den Versuchen von Ellis et al 1994 wurde Apamin benutzt, um als Antagonist von calciumabhängigen Kaliumkanälen zu fungieren. Ein wichtiges Charakteristikum der

Substanz besteht darin, daß es nur eine bestimmte Art der calciumabhängigen Kaliumkanäle blockiert, nämlich die mit einer kleinen Leitfähigkeit (Ellis et al, 1994, S.784). Insgesamt konnten drei Typen von calciumabhängigen Kaliumkanälen identifiziert werden, wobei also Apamin eine Wirkung nur auf die letzten beiden Kanäle entfalten kann:

- Kanäle mit einer großen Leitfähigkeit
- Kanäle mit einer intermediären Leitfähigkeit; das sind Kanäle, die durch extern zugeführtes Apamin blockierbar sind;
- Kanäle mit einer geringen Leitfähigkeit; diese Kanäle sind ebenfalls durch Apamin zu inhibieren; man vermutet, daß es diese Kanäle sind, die die Membranhypolarisation vermitteln, die durch purinerge Agonisten ausgelöst wird;

Die Messung der Kaliumströme kann, wie etwa in den Versuchen von Vogalis et al mit Hilfe der Patch-clamp-Technik erfolgen. Es kam in ihren 1997 durchgeführten Versuchen nach Zugabe von Apamin in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^{-6} \text{M}$  zu einer Abnahme der als Folge von Depolarisationen registrierten Kaliumströme um 70% (Vogalis et al, 1997, S.505). Da Apamin einen inhibierenden Effekt auf calciumabhängige Kaliumkanäle ausübt, diese Kanäle jedoch einen inhibierenden Einfluß auf die Aktivität des Darmes haben, läßt sich die exzitatorische Wirkung, die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit durch Apamin erzielt wurde, erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde Apamin in den Konzentrationen  $10^{-11} \text{M}$  bis  $10^{-7} \text{M}$  verwendet. Diese Konzentrationen entsprechen den in der Literatur beschriebenen Versuchen mit Apamin. Von Maggi et al z.B. ist der Einsatz dieser Substanz vor allem in den Konzentrationsbereichen  $0,01-0,3 \times 10^{-7} \text{M}$  beschrieben, da hier die stärkste Wirkung beobachtet wurde (Maggi et al, 1993, S.631). In den Versuchen von Suzuki et al führte Apamin in einer Konzentration von  $>3 \times 10^{-9} \text{M}$  zu einer dosisabhängigen Steigerung der Amplitude der Spontankontraktionen des Meerschweinchen-Magens, ohne dabei die Frequenz zu verändern. Bei der Aktion von Apamin kam es zu einer Erhöhung der Schwankung des intrazellulären Calciums. Diese Arbeitsgruppe beschreibt den Effekt von Apamin als eine Erhöhung der Rate von "slow waves", jedoch übt Apamin keine Wirkung auf das Membran-Ruhepotential aus (Suzuki et al, 1993, S.665). In den vorliegenden Versuchen zeigte Apamin eine deutlich dosisabhängige Wirkung als exzitatorische Substanz. Die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nahm stark zu nach Zugabe von Apamin in das Organbad. Diese Daten legen wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, daß im Ruhezustand die Zellmembran durch geöffnete calciumabhängige Kaliumkanäle hyperpolarisiert wird oder daß ein inhibitorischer Neurotransmitter freigesetzt wird, der die Kanäle aktiviert.

### 5.3.2. Pirenzepin

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit auch der  $M_1$ -selektive muskarinerge Antagonist Pirenzepin ( $pIC_{50}=7,0$ ,  $pk_B=6,0-6,9$ ) untersucht. In der Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit zeigte Pirenzepin einen hemmenden Effekt auf die Kontraktionskraft des untersuchten Ileumsegmentes der Ratte. Bei der Konzentration  $10^{-8}M$  war etwa die Hälfte der Kontraktionsstärke inhibiert. In der Literatur wird dieser Effekt bestätigt. Kurjak et al berichten ebenfalls von der Hemmung der Kontraktionsantwort im Ileum der Ratte. Die hohe notwendige Konzentration der Substanz bis zum Eintreten des ausgelösten Effektes kann dadurch erklärt werden, daß die Kontraktion der Zirkulärmuskulatur hauptsächlich über  $M_2$ -Rezeptoren und nur in geringem Maß über  $M_1$ -Rezeptoren vermittelt wird (Kurjak et al, 1999, S.895). Elloriana et al konnten 1996 definitiv nachweisen, daß im Ileum der Ratte an der durch Acetylcholin ausgelösten Kontraktion sowohl  $M_1$ - als auch  $M_2$ -Rezeptoren beteiligt sind (Elloriaga et al, 1996, S.818).

### 5.3.3. Methoctramin

Zur Charakterisierung des Modells wurde in der vorliegenden Arbeit der  $M_2$ -Rezeptor Methoctramin untersucht. Es zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der induzierten Kontraktionen. In den Versuchen wurden Konzentrationen von  $10^{-10}M$  bis  $10^{-5}M$  verwendet. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Angaben in der Literatur. So beschreiben Kurjak et al entsprechende Ergebnisse ( $pk_{B50}=9,3$ ). Die Kontraktion der zirkulären Muskulatur wird in erster Linie durch  $M_2$ -Rezeptoren vermittelt. Dies konnte gezeigt werden, da  $M_1$ - und  $M_2$ -Rezeptor-Antagonisten nur in wesentlich höherer Konzentration eine Hemmung bewirkten (Kurjak et al, 1999, S.895). Der Rezeptor, der den aufsteigenden

Reflex auslöst entspricht somit auch einem  $M_2$ -Rezeptor. Als Wirkungsweise der  $M_2$ -Rezeptor-Antagonisten wird das Schließen von Kationenkanälen postuliert, während die Veränderung dieser Kanäle durch  $M_3$ -Rezeptoren vermittelt wird (Kurjak et al, 1999, S.895). Es wurde zudem auch die Hypothese aufgestellt, daß Methoctramin die inhibierende Wirkung über eine Interaktion mit Rezeptoren an nikotineren Ganglien bewirkt. Da jedoch Methoctramin eine starke Wirkung auf [ $^3$ H]N-methylscopolamin ausübt, das an Synaptosome bindet, die frei sind von Ganglien und somatodendritischen Rezeptoren, läßt sich daraus schließen, daß die inhibitorische Wirkung von Methoctramin auf den ascendierenden Reflex durch muskarinerge und nicht durch nikotinerge Rezeptoren ausgelöst wird (Kurjak et al, 1999, S.895).

#### **5.3.4. Hexahydrosiladifenidol**

Es gibt fünf Hauptgruppen der muskarinergen Rezeptoren:  $M_1$ -  $M_5$ -Rezeptoren (Moser et al, 1989, S.319, 323). Bei Hexahydrosiladifenidol handelt es sich um einen  $M_3$ -selektiven muscarinergen Antagonisten mit einem  $PIC_{50}$  von 7,7. (Moser et al, 1989, S.319; Soejima et al, 1993, S.1; Yang et al, 1993, S.666).

Delmendo et al verwendeten in ihren Versuchen 1989 die stark verwandte Substanz Hexahydrosilaprocyclidine und erzielten mit ihrer Hilfe eine eher  $M_1$ -spezifische Hemmung (Delmendo et al, 1989, S.457). Es wird in der Literatur beschrieben, daß  $M_3$ -Rezeptoren die Kontraktion sowohl der longitudinalen als auch der zirkulären Muskulatur des Meerschweinchen Ileum vermitteln. Es konnte hier der Beweis geführt werden, daß dieser Rezeptortyp an der motorischen Antwort auch der Zirkulärmuskulatur beteiligt ist (Doods et al, 1994, S.280). Im Ileum der Ratte konnte gezeigt werden, daß die durch Acetylcholin ausgelöste Kontraktion des Ileum der Ratte sowohl eine Steuerung durch  $M_2$ -Rezeptoren wie auch durch  $M_3$ -Rezeptoren beinhaltet (Elloriaga et al, 1996, S.817; Kurjak et al, 1999, S.895). Diese Ergebnisse unterstützen in vollem Maße die in der vorliegenden Arbeit erzielten Beobachtungen. Hexa-hydro-difenidol bewirkte bei alleiniger Zugabe eine deutliche, dosisabhängige Hemmung der durch elektrische Feldstimulation erzielten Kontraktion. Dies läßt sich durch die Annahme erklären, daß dieser Reflex durch  $M_3$ -Rezeptoren vermittelt wird.

Insgesamt läßt sich sagen, daß die muskarinerge Rezeptoren, die sich prä- und postganglionär befinden, eine bedeutende Rolle in der Auslösung des aszendierenden Reflexes spielen. Die vorliegende Arbeit konnte die Ergebnisse der Literatur, nämlich daß hier die  $M_2$ -Rezeptoren eine bedeutendere Rolle als etwa die  $M_1$ -Rezeptoren spielen durch die hohe Konzentration, die an Pirenzepin für die Hemmung benötigt wurde bestätigen.

### **5.3.5. $A_1$ -Agonist- und Antagonist und $A_2$ -Agonist- und Antagonist**

Die Wirkung des spezifischen  $A_1$ -Antagonisten DPCPX und  $A_2$ -Agonisten DMPX beweisen, daß endogene Adenosine durch Wirkung auf  $A_1$ - und  $A_2$ -Rezeptoren an der Regulierung des aszendierenden myenterischen Reflexes im Rattenileum teilnehmen. Während der  $A_1$ -Rezeptor-Antagonist DPCPX die Reflexantwort inhibierte, verstärkte ihn der  $A_2$ -Antagonist DMPX und so zeigten Agonist und Antagonist den exzitatorischen Einfluß von Adenosin über  $A_1$ -Rezeptoren und den inhibitorischen Einfluß über  $A_2$ -Rezeptoren.

Die Effekte, die mit den Rezeptor-Antagonisten erzielt wurden, werden von den Resultaten der Versuche mit den  $A_1$ - und  $A_2$ -Agonisten CPA und CPCA unterstützt. Diese Versuche zeigen, daß exogenes Adenosin in der Lage ist den durch elektrische Feldstimulation ausgelösten aszendierenden Reflex zu beeinflussen. Der stimulierende  $A_1$ -Effekt wurde durch den  $A_1$ -Antagonisten aufgehoben und ist also über  $A_1$ -Rezeptoren gesteuert. Auf der anderen Seite zeigte die durch den  $A_2$ -Agonisten CPCA ausgelöste Inhibierung der Reflexantwort die Tendenz durch den spezifischen  $A_2$ -Antagonisten DMPX ( $10^{-6}M$ ,  $10^{-5}M$ ) reduziert zu werden. Wegen der schlechten Lösbarkeit des Xanthinderivates DMPX konnten keine höhere Konzentration dieses Antagonisten verwendet werden.

### **5.3.5.1. N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosin (CPA)**

CPA wurde in der Literatur wie in der vorliegenden Arbeit als potenter A<sub>1</sub>-Agonist verwendet. Bis 1986 galt der weniger planar gebaute A<sub>1</sub>-Agonist CHA als der stärkste A<sub>1</sub>-Agonist. Jedoch konnten Williams et al 1986 am Rattengehirn zeigen, daß die Selektivität von CPA doppelt so stark war (Williams et al, 1986, S.179, 181, 182). Dies war die Ursache warum in den Versuchen der vorliegenden Arbeit CPA als spezifischer A<sub>1</sub>-Agonist gewählt wurde.

Die Zugabe von CPA als externen A<sub>1</sub>-Agonisten in das Organbad führte zu einer deutlichen Steigerung der Reflexantwort. Hiermit konnte nachgewiesen werden, daß externes Adenosin zu einer Beeinflussung des aufsteigenden myenterischen Reflexes führt. Die maximale Wirkstärke wurde in den vorliegenden Versuchen bei einer Konzentration von 10<sup>-8</sup>M erzielt. Im Vergleich dazu kam es bei Williams et al bei der Konzentration 10<sup>-9</sup>M zur maximalen Wirkung (Williams et al, 1986, S.179, 181, 182). Die Erklärung hierfür könnte sein, daß in unterschiedlichen Organsystemen - die Versuche von Williams et al wurden am Gehirn der Ratte durchgeführt - die Verhältnisse etwas unterschiedlich sind. Jedoch war die Agonisten-Wirkung genauso bei Williams et al wie auch bei den vorliegenden Versuchen durch einen A<sub>1</sub>-Antagonisten reversibel, was dafür spricht, daß der Effekt ein spezifischer, allein durch die Aktivierung des A<sub>1</sub>-Rezeptors ausgelöster Effekt ist. Zudem zeigte sich in beiden Fällen ein Sättigungspunkt, die Wirkung war also nur bis zu einer bestimmten Konzentration des Agonisten zu steigern.

### **5.3.5.2. 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX)**

Die ermittelte Inhibitionskonstante IC<sub>50</sub>, also die Konzentration, bei der 50% der Kontraktionsantwort gehemmt wird, lag in den vorliegenden Versuchen für DPCPX bei 2x10<sup>-7</sup> M. Die maximale Inhibition wurde mit 24,2% des Ausgangswertes bestimmt. Diese Substanz erwies sich als äußerst potenter und spezifischer A<sub>1</sub>-Antagonist. Die antagonisierende Wirkung war direkt proportional zur Konzentration. Bei Konzentrationen von 10<sup>-5</sup> M konnte die zuvor vorhandene

Kontraktionsantwort beinahe vollständig aufgehoben werden. Die zum Vergleich herangezogenen Angaben aus der Literatur zeigen Inhibitionskonstanten, die erheblich variieren. Redman und Silinsky z.B. erzielten einen  $IC_{50}$ -Wert von  $10^{-12}$  M (Redman et al, 1993, S.837), Sebastiao und Ribeiro einen von  $3,5 \times 10^{-9}$  M (Sebastiao et al, 1989, S.211, 215) und der Wert lag bei  $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  bei Collis et al (Collis et al, 1989, S.1276). Die Ursache für diese Unterschiede ist in der Verwendung unterschiedlicher Species und unterschiedlicher Versuchsaufbauten zu suchen. Zudem wurden in den zitierten Arbeiten auch andere Organsystem, wie etwa die neoromuskuläres Gewebe verwendet.

Der antagonistisierende Effekt erfolgte sowohl auf exogene als auch auf endogene Adenosine.

Im ersteren Fall wurde der  $A_1$ -Adenosinagonist CPA dem Organbad zugegeben, was zu einer starken Kontraktionsantwort führte.

Die Wirkung auf Stimulation durch endogen ausgeschüttetes Adenosin konnte dadurch bestätigt werden, daß DCPX eine inhibitorische Wirkung ausübt auch wenn zuvor kein  $A_1$ -Agonist dem Organbad zugegeben wurde. Da die Substanz in dieser Konzentration selektiv nur auf  $A_1$ -Rezeptoren wirkt, kann man daraus schließen, daß endogen freigesetztes Adenosin eine Aktivierung von  $A_1$ -Rezeptoren bewirkt.

Die Tatsache, daß der spezifische  $A_1$ -Rezeptor-Antagonist DPCPX in der Lage war die Reflexantwort in unserem Versuchsaufbau zu inhibieren steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hancock und Cooper (Hancock et al, 1995, S.739). Sie verwendeten einen anderen Versuchsaufbau, bei dem sie die Reflexstimulation mit der Einführung von intraluminaler Flüssigkeit auslösten und die Reflexantwort an der Kontraktion der Longitudinalmuskulatur und der Menge von verdrängtem Volumen als Folge der Kontraktion der Zirkulärmuskulatur oral des Stimulationsortes gemessen haben. Bei ihren Versuchen konnten sie keinerlei Einfluß des  $A_1$ -Rezeptor-Antagonisten DPCPX auf die Reflexantwort des peristaltischen Reflexes messen, wenn zuvor kein exogener Adenosinagonist zugegeben wurde (Hancock et al, 1995, S.739). In früheren Versuchen, bei denen sie einen Versuchsaufbau mit elektrischer Feldstimulation verwendeten, untersuchten die selben Autoren hohe Konzentrationen an 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA), das die cholinerge Reflexantwort nicht beeinflusste (Coupar et al, 1994, S.801). Als Schlußfolgerung aus beiden Versuchen beschreiben die Autoren eine Modulation des peristaltischen Reflexes mit einem Angriffspunkt der Adenosinwirkung proximal der am Ende des Reflexbogens liegender cholinergere Neurone. Zudem verneinen sie die Freisetzung von endogenem Adenosin in beiden Versuchsaufbauten (Hancock et al, 1995, S.739). Jedoch verwendeten sie im Modell mit der elektrischen Feldstimulation keinen spezifischen  $A_1$ -Rezeptor-Antagonisten wie z.B. DPCPX, was die beste Möglichkeit gewesen wäre, die Freisetzung des endogenen Neurotransmitters zu zeigen. Im Modell, bei dem sie die Reflexantwort durch intraluminale Flüssigkeitsgabe auslösten, verwendeten sie DPCPX in der Konzentration 10nM, also in einer 10-fach niedrigeren Konzentration, als in den

Versuchen der vorliegenden Arbeit. Selbst wenn man den Konzentrationsunterschied außer Acht läßt, besteht auch die Möglichkeit, daß unter den Bedingungen eines *in vitro*-Versuches mit Reflexauslösung durch intraluminale Flüssigkeitszufuhr es nicht zu einer Freisetzung von endogenem Adenosin kommt. Es gibt einen grundsätzlichen Unterschied zwischen einerseits der myenterischen Reflexpräparation und andererseits peristaltischen Modellen wie der Versuchsaufbau mit Dehnungsreiz durch Flüssigkeitszufuhr, bei dem die Longitudinalmuskulatur eine wichtige Rolle spielt. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß es zu einem Abfall der aszendierenden kontraktilen Muskelantwort nach Zugabe des Adenosinantagonisten DPCPX kam. Dies beweist die Freisetzung von endogenem Adenosin unter den Bedingungen einer durch elektrischen Feldstimulation ausgelösten aszendierenden myenterischen Reflexes.

Die antagonisierende Wirkung von DPCPX war spezifisch für  $A_1$ -Rezeptoren, da die kontraktionsfördernde Wirkung des  $A_2$ -Antagonisten 3,7-Dimethyl-1-Propargylxanthin nicht aufgehoben werden konnte. Die Versuche von Redman und Silinsky bestätigten diese Tatsache. Sie untersuchten 1993 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin an motorischen Endplatten von Fröschen. Ihre Arbeitshypothese war, daß DPCPX als Antagonist nicht selektiv auf  $A_1$ -Rezeptoren wirkt, sondern daß es die hemmende Wirkung auch an präsynaptischen  $A_3$ -Rezeptoren entfaltet (Redman et al, 1993, S. 835, 839). Diese  $A_3$ -Rezeptoren üben ihren Effekt über eine Änderung der Calciumleitfähigkeit aus. Die durchgeführten Messungen ergaben, daß bei der Einwirkung von DPCPX keine Veränderung der Calciumströme beobachtet wurde, sodaß ein Wirkmechanismus über  $A_3$ -Rezeptoren ausgeschlossen wurde. Auch Reeves et al bestätigten in ihren Versuchen am Colon der Ratte den spezifischen, auf  $A_1$ -Rezeptoren wirkenden Effekt von DPCPX. Diese Substanz konnte die Kontraktionen, die durch  $A_1$ -Agonisten ausgelöst wurden, inhibieren, wobei der  $pK_B$ -Wert bei 9,2 bis 9,5 lag (Reeves et al, 1993, S.1255). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, daß DPCPX ein spezifischer  $A_1$ -Rezeptor-Antagonist ist. DPCPX konnte die Wirkung des  $A_1$ -Agonisten, nicht jedoch des  $A_2$ -Agonisten antagonisieren. In der Literatur wurden neben CPA zu diesem Zweck auch andere spezifische  $A_1$ -Rezeptor-Agonisten, wie etwa von Chern et al das CGS21680 verwendet (Chern et al, 1993, S.950).

Es stellt sich die Frage, ob diese spezifische,  $A_1$ -Rezeptor-antagonisierende Wirkung von DPCPX nur *in vitro* besteht. Um dies zu untersuchen verwendeten Malhotra et al DPCPX, um seine Wirkung auf die artefiziell ausgelösten Krämpfe bei Ratten zu beobachten. Sie fanden, daß der selektive  $A_1$ -Antagonist in einer Konzentration von 1mg/kg Körpergewicht den protektiven Effekt von zuvor zugegebenem CPA vollständig aufhob. Dies ist ein Beweis dafür, daß DPCPX den spezifischen  $A_1$ -Agonisten CPA auch *in vivo* zu 100% antagonisieren kann (Malhotra et al, 1997, S.285).

Insgesamt läßt sich als Schlußfolgerung festhalten, daß exogene  $A_1$ -Agonisten über die  $A_1$ -Rezeptoren einen stimulierenden Effekt auslösen, wobei diese Wirkung durch  $A_1$ -Antagonisten komplett aufgehoben werden kann.

### 5.3.5.3. 5'-(N-Cyclopropyl)carboxamido-adenosine (CPCA)

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde durch Zugabe des selektiven  $A_2$ -Antagonisten DMPX die Wirkung des  $A_2$ -Agonisten CPCA gehemmt. Der Effekt von CPCA konnte durch den spezifischen  $A_1$ -Antagonisten DPCPC nicht beeinflußt werden, was beweisend dafür ist, daß die Wirkung von CPCA ein reiner  $A_2$ -Effekt ist. Diese Selektivität wurde durch die Arbeit von Hadjkaddour et al bestätigt. Sie zeigten mit ihren Versuchen 1996, daß der  $A_2$ -selektive Agonist CPCA genauso wie der  $A_1$ -selektive Agonist CPA an der durch Carbachol kontrahierten Trachea des Meerschweinchens eine Relaxation bewirkt. Die Wirkung beider Substanzen war streng konzentrationsabhängig. Die Wirkung von CPCA, nicht aber die von CPA wurde durch den selektiven  $A_2$ -Antagonisten DMPX antagonisiert (Hadjkaddour et al, 1996, S.275). Dies ist ein Hinweis auf die Selektivität von DMPX. Glibenclamid, ein ATP-Kanal-Inhibitor, hemmte ebenfalls die Wirkung von DMPX, sodaß geschlossen werden kann, daß der DMPX-Effekt zum Teil über Glibenclamid-sensitive Kanäle vermittelt wird (Hadjkaddour et al, 1996, S.275).

Im Gastrointestinaltrakt führt exogen zugeführtes CPCA nicht ausschließlich im Bereich des Ileum, sondern auch des Magens zu einer spezifischen Wirkung. Muller et al führten 1994 Versuche an der muscularis mucosae des Kaninchenmagens durch. Sie interessierten sich dafür, welche Art von Adenosinrezeptoren an der Kontraktion der muscularis mucosae beteiligt sind. Alle verwendeten  $A_2$ -Agonisten bewirkten eine Kontraktion der Muskelschicht. Bei der Untersuchung der  $A_2$ -Agonisten stellte sich heraus, daß CPCA von allen  $A_2$ -Agonisten die höchste Potenz zeigte (Muller et al, 1994, S.154). Der  $A_1$ -Antagonist DPCPX hingegen zeigte keinerlei antagonisierende Wirkung auf den durch CPCA ausgelösten Effekt, sodaß angenommen werden kann, daß ausschließlich  $A_2$ -Rezeptoren die kontraktile Wirkung an der muscularis mucosae des Kaninchens bewirken.

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse entsprechen denen der vorliegenden Arbeit. Auch in den vorliegenden Versuchen zeigte sich ein selektiver  $A_2$ -Effekt von CPCA, der im Bereich des Rattenileum jedoch eine Verringerung der Kontraktionskraft bewirkte. Die Wirkung war ebenso wie in den Versuchen von Hadjkaddour et al durch den  $A_2$ -selektiven Antagonisten DMPX antagonisierbar. Dies könnte darauf hindeuten, daß der  $A_2$ -Rezeptor in der Darmmuskulatur anders gekoppelt ist oder daß die  $A_2$ -Wirkung indirekt, d.h. durch eine Wirkung z.B. auf neurale Strukturen vermittelt wird.

#### **5.3.5.4. 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX)**

Das Bestreben Substanzen zu entwickeln, die in vitro und in vivo die Funktion von Adenosinantagonisten erfüllen können, führte zur Erforschung von Caffein und Theophyllin. Diese Xanthine zeigen eine Aktivität in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-5}$  bis  $10^{-4}$  M, wobei keine bzw. nur sehr geringfügige Selektivität nachzuweisen ist.

Einige substituierte 8-Phenyl-Xanthine zeigen eine  $A_2$ -Selektivität, mit einem  $K_i$ -Wert von  $10^{-13}$ . Eine wesentlich erhöhte Affinität konnte durch Substitution der Methylgruppen an Xanthine durch n-Propyl- oder Propargylgruppen erreicht werden. Es zeigte sich, daß z.B. 1,3-di-n-Propyl-Xanthin eine im Vergleich zu Theophyllin um das 20-Fache erhöhte Aktivität aufwies. So kam es zur Herstellung von 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX), einem Caffein-Analogon, das genauso wie das strukturähnliche 1,3-dimethyl-7-propargylxanthin ein  $A_2$ -spezifischer Adenosinantagonist ist. Hierbei erwies sich DMPX, das auch in unseren Versuchen Verwendung fand, als der potentere der beiden  $A_2$ -Antagonisten. Nachdem die in vitro Aktivität von DMPX nachgewiesen war, wurde auf drei Arten auch die in vivo Wirkung an Mäusen gezeigt:

- durch DMPX kam es zu einer Blockade der durch Adenosin-Agonisten ausgelösten Hyperthermie; hierbei handelt es sich um eine periphere Wirkung (Seale et al, 1988, S.1671, 1672, 1680);

- ebenfalls wurde durch DMPX ausgelöst eine Blockade der durch Adenosin-Agonisten bedingten Unterdrückung der lokomotorischen Aktivität beobachtet; diese Aktion ist zentral vermittelt;
- schließlich kam es durch DMPX direkt zu einer zentralen Stimulation der lokomotorischen Aktivität (Seale et al, 1988, S.1671, 1672, 1680);

Aus den Versuchen von Seale et al kann man ableiten, daß DMPX ein potenter und selektiver  $A_2$ -Rezeptor-Antagonist ist. Dies gilt in vivo sowohl peripher als auch zentral. In seiner Fähigkeit motorische Aktivität intrinsisch zu stimulieren, ist DMPX ebenso potent wie Caffein und sogar potenter als Theophyllin (Seale et al, 1988, S.1671, 1672, 1680).

Diese Beobachtungen stimmen gut mit den Versuchen dieser Arbeit überein. Hier wurde ebenfalls eine spezifische  $A_2$ -antagonisierende Wirkung von DMPX beobachtet, wobei die Substanz die maximale Hemmwirkung bei einer Konzentration von  $10^{-13}M$  erreichte. Die  $A_2$ -antagonisierende Wirkung drückte sich in diesen Versuchen durch eine Zunahme der Kontraktionsantwort des Ileumsegmentes aus, da zuvor der  $A_2$ -Agonist CPA eine Abnahme der Kontraktionsstärke bewirkt hatte. DMPX konnte nur die CPA-Wirkung, jedoch nicht den Effekt von anderen Agonisten aufheben, ist also ein spezifischer  $A_2$ -Antagonist. Die Spezifität von DMPX auch in vivo beweisen die Versuche von Malhorta et al. Sie lösten artifiziell generalisierte Krämpfe bei Ratten aus. Hierbei kamen sie zu folgendem Ergebnis: wenn nach CPA-Gabe zusätzlich eine DMPX-Gabe erfolgte, kam es anders als bei nachfolgender DPCPX-Gabe nicht zu einer Inhibierung der CPA-Wirkung. Dies ist der Beweis sowohl dafür, daß CPA ein selektiver  $A_2$ -Agonist ist, wie auch dafür, daß es sich bei DMPX um einen selektiven  $A_2$ -Antagonisten handeln muß (Malhotra et al, 1997, S.286).

Auch wenn zuvor kein  $A_2$ -Agonist dem Organbad zugegeben wurde, kam es in den Versuchen der vorliegenden Arbeit durch DMPX ausgelöst zu einer Verstärkung der Kontraktionsantwort, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß DMPX sowohl auf exogen zugeführte  $A_2$ -Agonisten, als auch auf endogenes Adenosin wirkt (Seale et al, 1988, S.1671, 1672, 1680). Aus diesen Daten kann gefolgert werden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Versuche mit  $A_2$ -Agonisten, daß  $A_2$ -Rezeptoren durch endogen freigesetzte Liganden normalerweise die Reflexantwort supprimieren.

### **5.3.6.3. A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonist**

Ongini und Fredholm beschäftigen sich in ihrer Arbeit 1996 mit den A<sub>2A</sub>-Rezeptoren. Der erste hochselektive A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonist ist KF17837 gewesen (Ongini et al, 1996, TIPS, S.364, 367, 368, 369, 371). Es zeigte bereits im niedrigen nanomolaren Bereich eine Affinität zu A<sub>2A</sub>-Rezeptoren und eine hohe Selektivität. Später wurden noch eine ganze Reihe von hochselektiven A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten entwickelt, wie etwa CP66713 oder CGS15943. Die A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: die Xanthin- und die Nicht-Xanthin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten. Die Nicht-Xanthin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten haben eine sehr hohe Affinität zu den A<sub>2A</sub>-Rezeptoren mit K<sub>i</sub>-Werten von 1-2x10<sup>-9</sup>M, während die Xanthin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten eine wesentlich niedrigere besitzen.

Die Untersuchungen über die therapeutische Verwendbarkeit von A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten zeigten, daß sie vor allem bei Erkrankungen des ZNS, z.B. bei M.Parkinson, einsetzbar waren. Zudem wurde nachgewiesen, daß A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten die Aktivierung von Neutrophilen unterbinden und somit zur Eindämmung von entzündlichen Reaktionen dienen können. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Versuche mit A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Agonisten- und Antagonisten durchgeführt, da sie zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche noch nicht zur Verfügung standen.

### **5.3.7. A<sub>3</sub>-Adenosin-Rezeptor-Antagonisten**

A<sub>3</sub>-Rezeptoren wurden später als die A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Rezeptoren entdeckt und erforscht. Da spezifische Antagonisten zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung standen, konnten diese Rezeptoren nicht untersucht werden.

Als erstes wurde der A<sub>3</sub>-Rezeptor im Gehirn der Ratte von Zhou et al (Zhou et al, 1992, S.7432) und später auch beim Menschen kloniert (Linden et al, 1993, S.524). Dieser Rezeptor zeichnet sich dadurch aus, daß er Affinität gegenüber den Substanzen 5'-N-ethyl-carboxamidoadenosine (NECA)

und N<sub>6</sub>-phenyl-isopropyladenosine zeigt. Die von Xanthin abgeleiteten A<sub>1</sub>-, A<sub>2a</sub>- und A<sub>2b</sub>-Adenosinantagonisten haben keinerlei Effekt auf diese Rezeptoren, was als Beweis dafür angesehen werden kann, daß es sich hierbei um eine neue Art eines Rezeptors handeln muß. N<sub>6</sub>-2-(4-amino-4-iodophenyl)ethyl (APNEA) ist bekannt als A<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist, und wird 125-Jod substituiert auch zur Markierung dieses Rezeptors verwendet.

Der A<sub>3</sub>-Rezeptor zeigt eine große Variabilität der Struktur, der Verteilung und der pharmakologischen Eigenschaften zwischen den verschiedenen Tierspecies (Linden et al, 1994, S.305).

Als Agonisten werden bestimmte 8-Phenyl-Derivate des Xanthins gefunden, die im Nanomolar-Bereich Affinität am A<sub>3</sub>-Rezeptor zeigen (Fozard et al, 1994, S. R5, R6). Einer der gefundenen Agonisten ist die Substanz APNEA. Sie erwies sich als spezifischer A<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist, da ihre Wirkung, nämlich die Fähigkeit eine Hypotension auszulösen, nicht durch die Nicht-A<sub>3</sub>-Antagonisten 8-(p-solphophenyl)theophyllin (8SPT) und 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthin (DPCPX) blockiert wurde (Fozard et al, 1994, S. R5, R6).

Hingegen zeigt das 8-phenyl-Derivat des Xanthins 3-(3-iodo-4-aminobenzyl)-8-(4-oxyacetat)-1-Propyl-Xanthin (BW-A522, FABOPX) eine A<sub>3</sub>-antagonisierende Wirkung, da sie dosisabhängig und reversibel den hypotensiven Effekt von APNEA blockiert. Diese antagonisierende Wirkung von BW-A522 ist interessanterweise speciesabhängig. Sie ist wesentlich potenter bei humanen A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptoren als bei der Ratte (Fozard et al, 1994, S. R5, R6).

Die Wirkstärke von A<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ist neben der Species, bei der sie verwendet werden, natürlich auch von ihrer molekularen Struktur abhängig. Alle bisherigen A<sub>3</sub>-Antagonisten sind 1,3-Dialkylxanthine-Derivate, die jedoch unterschiedliche Substrate an der 1-, 3-, und 8-Purinposition und an der 5'-Ribose-Position (Kim et al, 1994, S.4020) haben. Am Gehirn der Ratte war 1,3-Dibutylxanthine-7-riboside-5'-N-methyl-carboxamide der effektivste der so synthetisierten Substanzen. Sie wirkte mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 229nM an A<sub>3</sub>-Rezeptoren. Dieser Stoff wirkte komplett antagonisierend an A<sub>3</sub>-Rezeptoren, und war an diesen Rezeptoren 160-mal effektiver als an A<sub>1</sub>-Rezeptoren und 400-mal wirksamer als an A<sub>2a</sub>-Rezeptoren, war also sehr spezifisch.

Bei der Ratte führen A<sub>3</sub>-Agonisten, wie bereits erwähnt, zu einer Hypotension in vivo. Es kann davon ausgegangen werden, daß im kardiovaskulären System der Ratte sich A<sub>3</sub>-Rezeptoren befinden, die bei ihrer Aktivierung die Hypotension auslösen (Fozard et al, 1994, S. R5, R6). Zudem konnte als wichtige Funktion von A<sub>3</sub>-Rezeptoren die Erleichterung der Degranulation von Mastzellen festgestellt werden. Ob sich hieraus eventuell auch physiologische Wirkungen und damit therapeutische Einsatzmöglichkeiten im Gastrointestinaltrakt ergeben bleibt abzuwarten. Es werden bereits selektive A<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten zur Therapie von allergischen Erkrankungen entwickelt (Linden et al, 1994, S.305).

### 5.3.8. alpha-beta-methylen-ATP

Seitdem die Freisetzung von Adenosin-Triphosphat aus isolierten Nervenendigungen im Dünndarm des Meerschweinchens 1982 von White und Leslie (White et al, 1982, S.206) nachgewiesen wurde, ist die Untersuchung der endogenen Purine ein wichtiger Bestandteil der Erforschung des Regulationskreislaufes des enterischen Reflexes geworden.

Aus diesem Grund wurde auch unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit die Substanz alpha-beta-methylen-ATP als Agonist eingesetzt. Die Verwendung von alpha-beta-methylen-ATP statt ATP erfolgte, da Versuche mit ATP im Versuchssystem der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden können, denn ATP zeigt eine sehr schnelle Tendenz zu zerfallen. Deshalb wurde in den Versuchen das stabile Analogon alpha-beta-methyl-ATP verwendet.

Alpha-beta-methylen-ATP ist ein selektiver Ligand für den  $P_{2y}$ -Rezeptor, der nicht degradiert werden kann und dadurch zu einer Desensibilisierung des  $P_{2y}$ -Rezeptors führen kann. Es konnte gezeigt werden, daß die Substanz die prazosinresistente Komponente der Kontraktion nach sympathetischer Nervenstimulation unterbinden konnte (Von Kugelgen et al, 1993, S.264). ATP kann so als Cotransmitter in peripheren efferenten Neuronen agieren. Gleichzeitig wirkt ATP auch an  $P_2$ -Rezeptoren von neuronalen Zellkörpern und Dendriten und erfüllt so die Funktion eines schnellen exzitatorischen Transmitters.

Der hemmende Effekt von alpha-beta-methylen-ATP kann folgendermaßen erklärt werden: ATP wie auch Noradrenalin wirkt als postganglionärer Co-Transmitter in sympathischen Fasern. Exogen zugeführtes ATP wirkt auf  $P_2$ -Rezeptoren der sympathetischen Nervenendigungen und löst eine Inhibition der Noradrenalinfreisetzung aus. Hierbei handelt es sich um eine negative Rückkoppelung, wobei ATP die Freisetzung eines Co-Transmitters hemmt. Dieser Mechanismus konnte im vas deferens der Maus nachgewiesen werden (Von Kugelgen et al, 1993, S.264). Zur Erklärung des Wirkmechanismus müssen auch die Versuche von Le Pard et herangezogen werden. Ihr Forschungsziel war es nachzuweisen wie  $P_2$ -Rezeptor-Agonisten- und Antagonisten die  $P_2$ -Rezeptor-vermittelt durch ATP ausgelöste schnelle exzitatorische postsynaptische Potentiale beeinflussen. Sie führten ihre Versuche an myenterischen Neuronen im Ileum des Meerschweinchens durch. Hierbei zeigte sich, daß alpha-beta-methylen-ATP in einer Konzentration von  $10^{-6}M$  die purinergen schnellen exzitatorischen postsynaptischen Potentiale reduzierte. Daraus kann gefolgert

werden, daß die schnellen exzitatorischen postsynaptischen Potentiale im Bereich des Dick- und Dünndarms zum Teil durch  $P_{2x}$ -Rezeptoren vermittelt werden (Le Pard et al, 1997, S.1532).

Der durch Zugabe von exogenem alpha-beta-methylen-ATP erzielte  $P_2$ -Effekt wird durch die Freisetzung einer entsprechenden endogenen Substanz in ähnlicher Weise ausgelöst. Im isolierten Ileum des Meerschweinchens können der  $P_2$ -Rezeptor-Antagonist PPADS und Suramin den kontraktile Effekt von alpha, beta-methylen-ATP stark inhibieren (Bartho et al, 1997, S.1507).

Da mehrere  $P_2$ -Rezeptoren bekannt sind, stellt sich die Frage welche an der Stimulation mit alpha, beta-methylen-ATP beteiligt sind. In der Literatur werden, ähnlich wie in den Versuchen der vorliegenden Arbeit, Kontraktionsversuche am Dünndarm beschrieben. Die getestete Substanz löste in einer Konzentration von  $100 \times 10^{-6} M$  eine vorübergehende Kontraktion aus, die dann von einer ATP-Freisetzung gefolgt wurde. Der ED 50-Wert betrug für den ersten Teil der Antwort  $5 \times 10^{-6} M$  und für den zweiten Teil  $25 \times 10^{-6} M$ . Die ATP-Freisetzung konnte durch die  $P_2$ -Antagonisten Suramin, Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',5'-disulphonic acid (PPADS) und reactive blue 2 gehemmt werden. Die Kontraktionsantwort jedoch konnten nur Suramin, Tetrodotoxin und Atropin, nicht jedoch PPADS und reactive blue 2 inhibieren. Die durch alpha-beta-methyl-ATP hervorgerufene Kontraktion konnte durch Calciumentzug stark erniedrigt werden, die ATP-Freisetzung wurde davon nicht beeinflusst. Aus den Versuchen von Matsuo et al kann geschlossen werden, daß die ATP-Freisetzung und die Kontraktion, die durch  $P_2$ -Agonisten, wie etwa alpha-beta-methyl-ATP am Meerschweinchenileum ausgelöst wird, auf der Stimulation von verschiedenen  $P_2$ -Rezeptoren beruht. Hierbei handelt es sich vermutlich um  $P_{2y}$ -Rezeptoren an der glatten Muskulatur und um  $P_{2x}$ -Rezeptoren an cholinergen Nervenendigungen. Die ATP-Freisetzung beruht zum Teil auch auf der Reizung von  $P_{2u}$ -Rezeptoren, da die Zugabe von UTP zu einer von reactive blue 2 nicht beeinflussbaren Freisetzung von ATP führte (Matsuo et al, 1997, S.1744).

### **5.3.9. reactive blue 2**

Bei reactive blue 2 handelt es sich um einen Antagonisten an  $P_{2y}$ -Rezeptoren, dessen  $-\log K_B$  bei 4,7 liegt, und der bei einer Konzentration von 30-100  $\mu M$  die stärkste inhibitorische Wirkung an  $P_{2y}$ -Rezeptoren ausübt (Knight et al, 1993, S.71; Fuder et al, 1993, S.355).

Die Tatsache, daß es sich bei reactive blue um einen spezifischen purinergen Antagonisten handelt wurde mehrfach nachgewiesen. So konnte an coeliacalen Neuronen des Meerschweinchens durch Zugabe von ATP zunächst eine exzitatorische Wirkung erzielt werden. Dieser Effekt wurde neurophysiologisch durch eine Depolarisierung der neuronalen Membran mit anschließendem Anstieg der Membranleitfähigkeit bewirkt. Wenn im Anschluß daran der Antagonist reactive blue 2 zugegeben wurde, kam es zu einer Aufhebung der durch ATP erzielten Wirkung. Der Effekt von Acetylcholin, der dessen des ATP entsprach, wurde durch reactive blue 2 nicht antagonisiert (Silinsky et al, 1993, S.210). Dennoch kann mit diesen Versuchen nicht die eindeutige Spezifität für Rezeptorsubtypen postuliert werden.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte reactive blue 2 bei exogener Zugabe in das Organbad eine starke exzitatorische Wirkung auf die Kontraktion des Ileumsegmentes. Es kann davon ausgegangen werden, daß hierbei reactive blue 2 die Wirkung von endogen ausgeschüttetem ATP antagonisiert. Dies entspricht auch der Beobachtung, daß exogen zugegebenes alpha-beta-methyl-ATP zu einer Inhibierung der Reflexantwort führt und umgekehrt durch Zugabe von Apamin, das die postsynaptische Wirkung von ATP blockiert, die Reflexantwort ebenfalls gesteigert wird.

## **6. Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle der Adenosine auf den ascendierenden myenterischen Reflex im Ileum der Ratte in vitro zu determinieren.

Zu diesem Zweck wurde ein Reflexmodell verwendet, in dem es möglich ist durch elektrische Feldstimulation die Verhältnisse des ascendierenden Reflexweges nachzuahmen. Durch eine

Messung der Änderung des intraluminalen Druckes mittels eines Manometers gelingt es auch geringfügige Änderungen im Kontraktionsverhalten des Ileumsegmentes zu registrieren.

Zunächst wurden in diesem System der  $M_1$ -Rezeptor-Antagonist Pirenzepin, der  $M_2$ -Rezeptor-Antagonist Methoctramin sowie der  $M_3$ -Antagonist Hexahydrosiladifenidol untersucht. Hierbei konnte die prädominante Beteiligung der cholinergen Neurotransmission an der ascendierenden Kontraktion des Dünndarmes aufgezeigt werden.

In einem nächsten Schritt ging es darum, die Rolle der endogenen und exogenen Adenosine auf den ascendierenden myenterischen Reflex zu untersuchen. Der selektive  $A_1$ -Antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropyl-xanthine (DPCPX  $10^{-9}M - 10^{-5}M$ ) bewirkte eine dosisabhängige Inhibierung der ausgelösten Kontraktionen. Im Vergleich dazu führte der  $A_2$ -Antagonist 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX) ( $10^{-15}M - 10^{-7}M$ ) zu einer Steigerung der Reflexantwort. Der  $A_1$ -Adenosin-Agonist  $N^6$ -cyclopentyladenosine (CPA,  $10^{-14}M - 10^{-8}M$ ) in exogen angewandter Form führte zu einer dosisabhängigen Stimulation der Kontraktionsantwort, was durch Zugabe des selektiven  $A_1$ -Antagonisten DPCPX ( $10^{-7} - 10^{-5}M$ ) aufgehoben werden konnte, jedoch nach Zugabe des  $A_2$ -Antagonisten DMPX unverändert blieb. Der  $A_2$ -Agonist 5'-(N-cyclopropyl)-carboxamido-adenosine (CPCA) inhibierte die durch den Reflex ausgelöste Kontraktion ( $10^{-11}M - 10^{-6}M$ ) und dieser Effekt wurde zum Teil durch den  $A_2$ -Antagonisten DMPX aufgehoben. Das ATP-Analogon alpha- $\beta$ -methylen-ATP führte zu einer Inhibierung der reflexinduzierten Kontraktion ( $10^{-9}M - 10^{-4}M$ ). Auf der anderen Seite führte der  $P_2$ -Antagonist reactive blue ( $10^{-6}M - 10^{-4}M$ ), eine Substanz bei der nachgewiesen wurde, daß sie eine ATP-induzierte Inhibition blockt, zu einer potenten Steigerung der Reflexantwort.

Die Ergebnisse zeigen, daß endogene Purine über eine Aktivierung von  $P_2$ -Rezeptoren eine inhibierende Wirkung auf den ascendierenden neuralen Reflex im Ileum ausüben. Auf der anderen Seite haben endogene Adenosine über  $A_1$ -Rezeptoren einen stimulierenden Effekt und über  $A_2$ -Rezeptoren einen inhibierenden Effekt auf den ascendierenden Reflex. Diese differentielle Beeinflussung kann zur Feinregulation der Reflexantwort durch einen Angriff im enterischen Nervensystem bzw. an der neuromuskulären Übertragung beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von endogenen und exogenen Adenosinen auf den ascendierenden Reflex im Ileum der Ratte aufgezeigt. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche waren  $A_{2a}$ -Rezeptor-Antagonisten sowie  $A_3$ -Rezeptor-Antagonisten nicht verfügbar. In Zukunft sollte die Wirkungsweise von  $A_{2a}$ - und  $A_3$ -Rezeptor-

Agonisten sowie -Antagonisten im Rahmen der Dünndarmkontraktion an dem hier verwendeten sehr bewährten Versuchsaufbau sicherlich untersucht werden.

## **8. Literaturverzeichnis**

1. Abbrachio, M., Burnstock, G.: Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64 (1994) 443-449.
2. Allescher, H.D., Berezin, I., Jury, J., Daniel, E.E.: Characteristics of canine lower esophageal sphincter: a new electrophysiological tool, *Am. J. Physiol., (Gastrointest.Liver Physiol. 18)*, 255 (1988) G451.
3. Allescher, H.D., Sattler, D., Piller, C., Schusdziara, V., Classen.M.: Ascending neural pathways in the rat ileum in vitro - effect of capsaicin and involvement of nitric oxide, *Eur. J. Pharmacol.*, 217 (1992) 159.
4. Allescher, H.D., Kurjak, M.: Neurotransmitter im enterischen Nervensystem; *Ökosystem Darm V*, M Zeitz et al (Hrsg), (1991) 127-128.
5. Avery R.K., Bleier K.J., Pasternack MS: Differences between ATP-mediated cytotoxicity and cell-mediated cytotoxicity, *J Immunol*, 149 (1992) 1263-1268.
6. Baer, H. P., Frew, R.: Relaxation of guinea pig fundic strip by adenosine, adenosine triphosphate and electrical stimulation: lack of antagonism by Theophylline or ATP treatment, *Br. J. Pharmacol.*, 67 (1979) 293-299.

7. Bailey, S.J., Hourani, S.M.: Effects of purines on the longitudinal muscle of the rat colon, *Br J Pharmacol*, 105(4) (1992) 882-888.
8. Bartho, L., Lenard, L.J, Maggi, C.A.: Evidence for the involvement of P<sub>2</sub>-purinoceptors in the cholinergic contraction of the guinea-pig ileum, *Br J Pharmacol*, 121(8) (1997) 1501-1510.
9. Bayliss, W., Starling, E.H.: The movements and innervation of the small intestine, *J Phys*, 24 (1899) 97-102.
10. Bednarek, F. J., Roloff, D. W.: Treatment of apnea of prematurity with aminophylline, *Pediatrics*, 58 (1976) 336.
11. Belhassen B., Pelleg A.: Acute management of paroxysmal supraventricular tachycardia: verapamil, adenosine triphosphate or adenosine?, *Am J Cardiol*, 54 (1984) 220-228.
12. Bertil, B.F., Abbracchio, M.P. Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P., Williams, M.: Nomenclature and classification of purinoceptors, *Pharmacol Rev*, 46 (1994) 145-146.
13. Bonnaffous, J. C. , Dornand, J., Faavero,J., Mani,J. C.: Lymphocyte membrane adenosine receptors coupled to adenylate cyclase: properties and occurrence in various lymphocyte subclasses, *J. Receptor. Res.*, 2 (1982) 348-352.
14. Bortoff, A., Ghalib, E.: Temporal relationship between electrical and mechanical activity of longitudinal and circular muscle during intestinal peristalsis, *Am. J. Dig. Dis.*, 4 (1972) 319-324.
15. Boucher, R. C., Knowles, M.R., Olivier, K.N., Bennett, W., Mason, S.J., Stutts, M.J.: Mechanisms and therapeutic actions of uridine triphosphate in the lung. In: Belardinelli L., Pelleg A., Adenosine and adenine nucleotides from molecular biology to integrative physiology. Kluwer Acad, Norwell, MA, (1995) 521-527.
16. Bülbring, E., Crema, A., Saxby, O.B.: A method for recording peristalsis in isolated intestine, *Br. J. Pharmacol.*, 13 (198) 439-445.

17. Burnstock, G.: Cardiovascular Receptors: Molecular, Pharmacological and Therapeutic Aspects. P. I: Korner and J. A. Angus, Eds. *Circulation Res.* 46 (Suppl. 1) (1980) 175-182.
18. Burnstock G.: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach, L. Bolis, Straub, R. W., Eds. (1978) 107-118. Raven Press. New York, NY..
19. Burnstock, G.: Coexistence of Neuronal Messengers: A New Principle in Chemical Transmission. *Progress in Brain Research.* T. Höfke, K. Fuxe and B. Pernow, Elsevier. Amsterdam, 68 (1986) 198-203.
20. Burnstock, G.: Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates, *Pharmacol Rev*, 21 (1969) 245-249.
21. Burnstock, G.: Neural nomenclature, *Nature*, 229 (1971) 282-283.
22. Burnstock G.: Physiological and pathological roles of purines: an update, *Drug Dev Res* 28 (1991) 193-197.
23. Burnstock, G.: Sympathetic purinergic transmission in small blood vessels, *TIPS*, 9 (1988) 114-118.
24. Burnstock, G.: The changing face of autonomic neurotransmission, *Acta Physiol. Scand.*, 126 (1981) 67-89.
25. Burnstock, G., T. Cocks, L. Kasakov and H. Wong: Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder, *Eur. J. Pharmacol.* 49 (1978) 143-148.
26. Burnstock, G., Crowe, R., Kennedy, C., Török, J.: Indirect evidence that purinergic modulation of perivascular adrenergic neurotransmission in the portal vein is a physiological process, *Br. J. Pharmacol.*, 82 (1984) 364-369.
27. Burnstock, G., Crowe, R., Wong, H. K.: Comparative pharmacological and histochemical evidence for purinergic inhibitory innervation of the portal vein of the rabbit, but not guinea-pig, *Br. J. Pharmacol.*, 65 (1979) 375-379.

28. Burnstock, G., Cusack, N. J., Hills, J. M., MacKenzie, I., Meghji, P.: Studies on the stereospecificity of the P<sub>2</sub> purinoreceptor, *Br. J. Pharmacol.*, 79 (1983) 909-913.
29. Burnstock, G., Hills, J. M., Hoyle, C. H. V.: Evidence that the P<sub>1</sub> purinoceptor in the guinea pig taenia coli is an A<sub>2</sub> subtype, *Br. J. Pharmacol.*, 81 (1984) 536-541.
30. Burnstock, G., Warland, J. J. I.: P<sub>2</sub>-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery: reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the P<sub>2y</sub>-but not the P<sub>2x</sub>-purinoceptors, *Br. J. Pharmacol.*, 90 (1987) 388-393.
31. Buxton, D. B., Robertson, S. M., Olson, M. S.: Stimulation of glycogenolysis by adenine nucleotides in the perfused rat liver, *Biochem. J.*, 237 (1986) 773-376.
32. Chern, Y., Lai, H.L., Fong, J.C., Liang, Y.: Multiple mechanisms for desensitization of A<sub>2a</sub> adenosine receptor-mediated cAMP elevation in rat pheochromocytoma PC12 cells, *Mol-Pharmacol*, 44(5) (1993) 948-953.
33. Cockcroft, S., Gomperts, B. D.: Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells, *J. Physiol. (London)* 296 (1979) 238-242.
34. Code, C.F., Marlett, J.A.: The interdigestive myoelectric complex of the stomach and small bowel of dogs, *J. Physiol (London)*, 246 81975) 289-293.
35. Collis, M. G.: Purines: Pharmacology and Physiological Roles, (T. W. Stone, ed.) Macmillan (1985) 75-84.
36. Collis, M. G., Hourani, S. M. O.: Adenosine receptor subtypes, *TIPS Reviews*, (1993) 357-361.
37. Collis, M. G., Shaw, G., Keddie, J.: Diuretic and saluretic effects of 1,3-dipropyl-8-cyclopentyladenosine, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43 (1991) 136-140.

38. Collis, M.G., Stogall, S.M., Martin, F.M.: Apparent affinity of 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine for adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors in isolated tissues from guinea-pigs, *Br. J. Pharmacol*, 97 (1989) 1273-1279.
39. Costa, M., Furness, J.B., Lewellyn-Smith, I.J.: *Histochemistry of the Enteric Nervous System, Physiology of the Gastrointestinal Tract*, New York, Raven Press, 105 (1987) 10-12.
40. Coupar, I.M., Hancock, D.L.: The adenosine agonist NECA inhibits intestinal secretion and peristalsis, *J Pharm Pharmacol*, 46 (1994) 801-7804.
41. Crowe, R., Burnstock, G.: Comparative positive plexus of stomach and intestine of guinea-pig, rabbit and rat, *Cell Tissue Res.*, 221 (1981) 103-109.
42. Cusack, N. J., Hourani, S. M. O., Loizou, G. D., Welford, L. A.: Pharmacological effects of isopolar phosphonate analogues of ATP on P2-purinoceptors in guinea-pig taenia coli and urinary bladder, *Br. J. Pharmacol.*, 90 (1987) 791-797.
43. Dascal, N.: The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22 (1987) 317, 380.
44. Daval, J.L., Nehlig, A., Nicolas, F.: Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. *Life Sci* 49 (1991) 1433-1436.
45. Delmendo, R.E., Michel, A.D., Whiting, R.L.: Affinity of muscarinic receptor antagonists for three putative muscarinic receptor binding sites *Br J Pharmacol*, 96 (1989) 455-458.
46. De Mey, J., Burnstock, G., Vanhoutte, G. P. M.: Modulation of the evoked release of noradrenaline in canine saphenous vein via presynaptic receptors for adenosine but not ATP, *Eur. J. Pharmacol.*, 55 (1979) 401-406.
47. Doods, H.H., Enzeroth, M., Ziegler, H., Mayer, N, Holzer, P.: Pharmacological profile of selective muscarinic receptor antagonists on guinea-pig ileal smooth muscle, *Eur J Pharmacol*, 253 (1994) 275-281.
48. Drury, A.N., Szent-Györgyi, *J Physiol*, 68 (1929) 213.

49. Du, C., Carl, A., Smith, T.K., Sanders, K.M., Keef, K.D.: Mechanism of Cyclic AMP-Induced Hyperpolarization in Canine Colon, *J. Pharm Exp Ther*, 268 (1993) 205-209.
  
50. Eglén, R.M., Michel, A.D., Whiting, R.L.: Characterisation of the muscarinic receptor subtype mediating contractions of the guinea-pig uterus, *Br J Pharmacol*, 96 (1989) 495-499.
  
51. Ellis, J. L., Burnstock, G.: Angiotensin neuromodulation of adrenergic and purinergic co-transmission in the guinea-pig vas deferens, *Br. J. Pharmacol.*, 97 (1989) 112-118.
  
52. Ellis, J. L., Burnstock, G.: Modulation of neurotransmission in the guinea-pig vas deferens by capsaicin: involvement of calcitonin gene-related peptide and substance P, *Br. J. Pharmacol.*, 98 (1989) 709-714.
  
53. Ellis, J.L., Conan, N.D.: Effect of potassium channel blockers on relaxations to a nitric oxide donor and to nonadrenergic nerve stimulation in guinea pig trachea, *J Pharmacol Exp Ther*, 271(2) (1994) 782-786.
  
54. Elloriaga, M., Anselmi, M., Hernandez, J.M., D'Ocon, P., Ivorra, D., The sources of Ca<sup>2+</sup> for muscarinergic receptor induced contraction in the rat ileum, *J Pharm Pharmacol*, 48 (1996) 817-819.
  
55. Erlinge D., You J., Wahlestedt C., Edvinsson L.: Characterisation of an ATP receptor mediating mitogenesis in vascular smooth muscle cells, *Eur J Pharmacol*, 289 (1995) 133-136.
  
56. Evans R.J., Cunnane T.C.: Relative Contributions of ATP and noradrenaline to the nerve evoked contraction of the rabbit jejunal artery, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 345 (1992) 421-427.
  
57. Fine J., Cole P., Davidson J.S.: Extracellular nucleotides stimulate receptor-mediated calcium mobilization and inositolphosphate production in human fibroblasts, *Biochem J*, 263 (1989) 369-374.

58. Fozard, J.R., Hannon, J.P.: BW-A522 blocks adenosine A<sub>3</sub> receptor-mediated hypotensive responses in the rat, *Eur. J. Pharmacol.*, 252 (1994) R5, R6.
59. Fredholm, B.B.: Towards a revised nomenclature of adenosine and P<sub>2</sub>- receptors, *trends pharmacol sci*, 18 (1996) 79-83.
60. Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P., Williams, M.: Nomenclature and classification of purinoceptors, *Pharmacol Rev*, 46(2) (1994) 147-153.
61. Frigo, G.M., Lecchini, S.: An improved method for studying the peristaltic reflex in the isolated colon, *Br J Pharmacol*, 39 (1970) 346-356.
62. Fuder, H., Muth, U.: ATP and endogenous agonists inhibition evoked (3H)- noradrenaline release in rat iris via A<sub>1</sub> and P<sub>2y</sub> - like purinoceptors, *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 348(4) (1993) 350-354.
63. Furness, J.B., Costa, M.: *The enteric nervous system*, Churchill Livingstone, Edinburgh:175 (1987) 1-5.
64. Gebicke-Haerter, P. J., Wurster, S., Schobert, A., Hertting, G.: P<sub>2</sub>-purinoceptors induced prostaglandin synthesis in primary rat astrocyte cultures, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 338 (1988) 703-707.
65. Gerwins, P., Fredholm, B.B.: ATP and its metabolites act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1,4,5-triphosphate in a smooth muscle cell line, *J Biol Chem*, 267(23) (1992) 16082-1608.
66. Gilfillan, A. M., Rooney, S. A.: Functional evidence for involvement of P<sub>2</sub> purinoceptor in the ATP stimulation of phosphatidylcholine secretion in type II alveolar epithelial cells, *Biochem. Biophys. Acta.*, 959 (1988) 332-37.
67. Gil-Rodrigo, C.E., Galdiz, B., Gadarias, J.M., Gomez, R., Ainz, L.F.: Characterisation of the effects of adenosine, adenosine 5'-triphosphate and related purines on acid secretion in isolated rabbit gastric glands, *Pharmacol Res*, 22 (1990) 102-105.

68. Ginsborg, B. L., Hirst, G. D. S.: The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat, *J. Physiol. (London)*, 224 (1972) 626-631.
69. Gordon, J. L.: Extracellular ATP: effects, sources and fate, *Biochem. J.*, 233 (1986)315-318.
70. Green, P.G., Basbaum, A.L., Helms, C., Levine, J.D.: Purinergic regulation of bradykinin-induced plasma extravasation and adjuvant-induced arthritis in the rat, *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 4159-4163.
71. Green, H.N., Stoner, H. B.: *Biological Actions of the Adenine Nucleotides*, Lewis, London, 53 (1950) 510-515.
72. Grider, J.R., Foxx-Orenstein, A.E., Jin, J.G.: 5-Hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptor agonists initiate the peristaltic reflex in human, rat and guinea pig intestine, *Gastroenterology*, 115(2) (1998) 370-80.
73. Grider, J.R., Jin, J.G.: Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation, *J Neu Sci*, 14(5) (1993) 2850-2856.
74. Griese, M., Gobran, L.I., Rooney, S.A.: A<sub>2</sub> and P<sub>2</sub> purine receptor interactions and surfactant interactions in primary cultures of type II cells, *Am J Physiol*, 261 (1991) L141-146.
75. Hadjkaddour, K., Michel, A., Laurent, F., Boucard, M.: Smooth muscle relaxant activity of A<sub>1</sub>-selective adenosine receptor agonists in guinea pig trachea: involvement of potassium channels, *Fundam Clin Pharmacol*, 10(3) (1996) 272-277.
76. Häggblad, J., Heilbronn, E.: P<sub>2</sub>-purinoceptor-stimulated phosphoinositide turnover in chick myotubes. Calcium mobilization and the role of guanyl-nucleotide-binding proteins, *FEBS Lett*, 235 (1988) 130-135.
77. Hagger, R., Finlayson, C., Jeffrey, I., Kumar, D.: Role of the interstitial cells of Cajal in the control of gut motility, *Br J Surg*, 84(4) (1997) 445-450.

78. Haleen, S.J., Steffen, R.P., Hamilton, H.W.: PD 116,948, a highly selective A1 adenosine receptor antagonist, *Life Sci*, 40 (1986) 557-563.
79. Hammond, J. R., MacDonald W. F., White, T. N.: Evoked secretion of (3H)nonadrenergic and ATP from nerve varicosities isolated from the myenteric plexus of the guinea pig ileum, *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 66 (1988) 369-372.
80. Hanani, M., Louzon, V., Miller, S.M., Faussone-Pellegrini, M.S.: Visualisation of interstitial cells of Cajal in the mouse colon by vital staining, *Cell Tissue Res*, 292(2) (1998) 2.
81. Hancock, D.L., Coupar, I.M.: Functional characterisation of the adenosine receptor mediating inhibition of peristalsis in the rat jejunum, *Br J Pharmacol*, 115 (1995) 739-744.
82. Häussinger, D., Stehle, T., Gerok, W., Tran-Thi, T.-A., Deckrler, K.: Hepatocyte heterogeneity in response to extracellular ATP, *Eur. J. Biochem*. 169 (1987) 646-651.
83. Hedqvist, P., Fredholm, B. B.: Effects of adenosine on adrenergic neurotransmission; prejunctional inhibition and postfunctional enhancement, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 293 (1976) 219-223.
84. Holck, M., Marks, B. H.: Purine nucleoside and nucleotide interactions on normal and subsensitive alpha adrenoreceptor responsiveness in guinea-pig vas deferens, *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 205 (1978) 113-117.
85. Holzer, P.: Ascending enteric reflex: multiple neurotransmitter systems and interactions, *Am. J. Physiol.*, 256 (1989) G538-543.
86. Hosoi, K., Fujishita, M., Sugita, K., Kurihara, K., Atsumi, T., Murai, T., Ueha, T.: P<sub>2</sub> purinergic receptors and cellular calcium metabolism in A431 human epidermoid carcinoma cells, *Am J Physiol*, 262 (1992) C633-637.
87. Hourani, S.M.O, Cusack, N.J.: Pharmacological receptors on blood platelets, *Pharmacol Rev*, 43 (1991) 240-246.

88. Houston, D. A., Burnstock, G., Vanhoutte, P. M.: Different P<sub>2</sub>-purinergic receptor subtypes of endothelium and smooth muscle in canine blood vessels, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241 (1987) 501-506.
89. Howell, L.L., Byrd, L.D.: Effects of CGS 15943, A Nonxanthine Adenosine Antagonist, on Behaviour in the Squirrel Monkey, *J Pharm and Exp Ther*, 267(1) (1993) 432-437.
90. Hoyle, C. H. V., Burnstock, G.: Evidence that ATP is a neurotransmitter in the frog heart, *Eur. J. Pharmacol.*, 124 (1986) 285-289.
91. Hukuhara, T., Yamagami, M., Nakayama, S.: The intestinal intrinsic reflexes, *Jap. J. Physiol.*, 8 (1958) 8-12.
92. Huizinga, J.D.: Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. Pathophysiology of GI motility related to interstitial cells of Cajal, *Am J Physiol*, 275(3 Pt1) (1998) G381-386.
93. Huizinga, J. D., Den Hertog, A.: Inhibition of fundic strips from guinea pig stomach: the effect of theophylline on responses to adenosine, ATP and intramural nerve stimulation, *Eur. J. Pharmacol.*, 63 (1980) 261-267.
94. Hukuhara, T., Yamagami, M., Nakayama, S.: The intestinal intrinsic reflexes, *Jap. J. Physiol.*, 8 (1958) 9-13.
95. Humphries, R. G., Robertson, M. J., Leff, P.: A novel series of P<sub>2T</sub> purinoceptor antagonists: definition of the role of ADP in arterial thrombosis, *Trends Pharmacol, Sci* 16 (1995) 177-182.
96. R. I., Honig, M. G.: Excitatory action of ATP on embryonic chick muscle, *J. Neurosci.*, 6 (1986) 685-690.
97. Jacobsen, E.J., Mc Call, J.M.: Acute ischemic and traumatic injury to the CNS, *Ann Rep Med Cem*, 25 (1990) 28-33.
98. Jahr, C.E., Jessel, T. M.: ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurons, *Nature*, 304 (1983) 730.

99. Kakei, M., Noma, A.: Adenosine-5'-triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart, *J. Physiol. (London)* 352 (1984) 276-283.
100. Kasakov, L., Burnstock, G.: The use of the slowly degradable analog alpha,beta-methylene ATP to produce desensitisation of the P<sub>2</sub>-purinergic effect of non-adrenergic responses of the guinea-pig urinary bladder, *Eur. J. Pharmacol.*, 86 (1983) 291-294.
101. Kellet, R., Bowmer, C. J., Collis, M. G., Yates, M. S. : Amelioration of glycerol-induced acute renal failure in the rat with 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, *Br. J. Pharmacol.*, 98 (1989) 1069-1073.
102. Keppens, S., De Wulf, H.: Characterisation of the liver P<sub>2</sub>-purinoceptor that mediates prostacyclin production by pig aortic endothelial cells, *Biochem J.*, 240 (1986) 368-371.
103. Kim, H.O., Ji, X.D., Melman, N., Olah, M.E., Stiles, G.L., Jacobson, K.A.: Selective ligands for rat A<sub>3</sub> adenosin receptors: structure-activity relationships of 1,3-dialkylxanthine 7-riboside derivatives, *J. Med. Chem.*, 37(23) (1994) 4018-4025.
104. Knight, G.E., Burnstock, G.: Identification of purinoceptors in the isolated stomach and intestine of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L., *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 106(1) (1993) 70-73.
105. Kolb, H. A., Wakelam, M. J. O.: Transmitter-like action of ATP on patched membrane of cultured myoblasts and myotubes, *Nature*, 303 (1983) 621.
106. Kosterlitz, H. W., Pirie, V. W., Robinson, J. A.: The mechanism of the peristaltic reflex in the isolated guinea-pig ileum, *J. Physiol. (London)*, 133 (1956) 679-682.
107. Kosterlitz, H. W., Pirie, V. W., Robinson, J. A.: Reflex contractions of the longitudinal muscle coat of the isolated guinea-pig ileum, *J. Physiol. (Lond.)*, 146 (1959) 365-371.

108. Kurjak, M., Sattler, D., Schusdziarra, V., Allescher, H.D., Characterisation of prejunctional and postjunctional muscarinic receptors of the ascending reflex contraction in rat ileum, *J Pharmacol Exp Ther*, 290(2) (1999) 893-900.
109. Laasberg, T.: Ca<sup>2+</sup>-mobilizing receptors of gastrulating chick embryo, *Comp Biochem Physiol*, 97 (1990) 9C.
110. Lagercrantz, H., Fried, G.: *Neurotransmitter Vesicles*, Academic Press. London, Eds. (1982) 174-188.
111. Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Winscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, E., Hildebrandt, C., Bäumert, H.G., Spatz-Gümbel, G., Mutschler, E.: PPADS, a novel functionally selective antagonist of P<sub>2</sub> purinoceptor-mediated responses, *Eur. J. Pharm.*, 217 (1992) 217-218.
112. Lavin, S.T., Southwell, B.R., Murphy, R., Jenkinson, K.M., Furness, J.B.: Activation of neurokinin 1 receptors on interstitial cells of Cajal of the guinea-pig small intestine by substance P, *Histochem Cell Biol*, 110(3) (1998) 266-207.
113. Ledent C., Dumont J.E., Vassart G., Parmentier M.: Thyroid expression of an A<sub>2</sub> adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism, *EMBO J*, 11 (1992) 537-542.
114. Le Pard, K.J., Messori, E., Galligan, J.J.: Purinergic fast excitatory postsynaptic potentials in myenteric neurons of guinea pig: distribution and pharmacology, *Gastroenterology*, 113(5) (1997) 1529-1533.
115. Linden, J.: Cloned adenosine A<sub>3</sub> receptors: pharmacological properties, species differences and receptor function, *TIPS*, 15 (1994) 298-305.
116. Linden, J., Taylor, H.E., Robeva, A.S., Tucker, A.L., Stehle, J.H., Rivkees, S.A., Fink, J.S., Reppert, S.M.: Molecular cloning and functional expression of a sheep A<sub>3</sub> adenosine receptor with widespread tissue distribution, *Mol. Pharmacol.*, 44 (1993) 522-526.

117. Liu, L.W., Farraway, L., Berezin, I., Huizinga, J.D.: Interstitial cells of Cajal: mediators of communication between circular and longitudinal muscle layers of canine colon, *Cell Tissue Res*, 294(1) (1998) 67-72.
118. Loubatières-Mariani M-M, Petit P., Chapal J., Hillaire-Buys D., Ribes G.: Effects of purinoceptor agonists on insuline secretion. In: Belardinelli L., Pelleg A., Adenosine and adenine nucleotides from molecular biology to integrative physiology. Kluwer Acad, Norwell, MA, (1995) 523-527.
119. Loubatieres-Mariani, M. M., Chapal, J.: Purinergic receptors involved in the stimulation of insuline and glucagon secretion, *Diabete. Metab.*, 14 (1988) 119-123.
120. Maggi, C.A., Giuliani, S.: Multiple inhibitory mechanisms mediate non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular uscle of the guinea-pig colon, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 347 (1993) 627-631.
121. Malhotra, J., Gupta, Y.K.: Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats, *Br J Pharmacol*, 120(2) (1997) 284-287.
122. Manzini, S., Hoyle, C. H. V., Burnstock, G.: An electrophysiological analysis of the effect of reactive blue 2, a putative P<sub>2</sub>-purinoceptor antagonist, on inhibitory junction potentials of rat caecum, *Eur. J. Pharmacol.*, 127 (1986) 198-201.
123. Martin G.N., Thom S.A.M., Sever P.S.: The effects of adenosine triphosphate (ATP) and related purines on human isolated subcutaneous and omental resistance arteries, *Br J Pharmacol*, 102 (1991) 643-646.
124. Matsuo, K., Katsuragi, T., Fujiki, S., Sato, C., Furukawa, T.: ATP release and contraction mediated by different P<sub>2</sub>-receptor subtypes in guinea-pig ileal smooth muscle, *Br J Pharmacol*, 121(8) (1997) 1742-1746.
125. Moneta, N.A., McDonald, T.J., Cook, M.A.: Endogenous adenosine inhibits evoked substance P releas from perfused networks of myenteric ganglia, *Am J Physiol*, 272 (1997) 38-41.

126. Moser, U., Lambrecht, G., Wagner, M., Wess, J., Mutschler, E.: Structure- activity relationships of new analogues of arecaidine propargyl ester at muscarinic M1 and M2 receptor subtypes, *Br J Pharmacol*, 96 (1989) 318-320.
127. Muller, M.J., Prior, T., Hunt, R.H., Rangachari, P.K.: Adenosine A<sub>1</sub>-receptors are not involved in contraction of canine gastric muscularis mucosae by adenosine analogues, *Eur J Pharmacol*, 251 (1994) 153-155.
128. Murgia M., Pizzo P., Zanovello P., Zambon A., Di Virgilio F.: In vitro cytotoxic effects of extracellular ATP, *ATLA-Alt L*, 20 (1992) 63-70.
129. Nahar, N.S., Torihashi, S., Iino, S., Senda, T., Chowdhury, J.U., Kobayashi, S.: Special smooth muscle cells along the submucosal surface of the guinea pig colon with reference to its spontaneous contractions, *Cell Tissue Res*, 293(1) (1998) 149-152.
130. Natori Y, Moriguchi m, Fujiwara S, Takeshita I, Fukui M, Iwaki T, Kanade : Effects of L-NMMA and L-NNA on the selective ATP-induced enhancement of intratumoral blood flow, *J oCereb Blood Flow Metab* 12 (1992) 119-123.
131. Needham, L., N. J. Cusack, J. D. Pearson, J. L. Gordon: Characteristics of the P<sub>2</sub> purinoceptor that mediates prostacyclin production by pig aortic endothelial cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 134 (1987) 198-203.
132. Okwuasaba, F. K., Hamilton, J. T., Cook, M. A.: Relaxation of guinea pig fundic strip by adenosine, adenine nucleotides and electrical stimulation: antagonism by theophylline and desensitization to adenosine and dervates, *Eur. J. Pharmacol.*, 46 (1977) 195-196.
133. Olah, M.E., Stiles, G.: Adenosine receptor subtypes: Characterisation and therapeutic regulation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35 (1995) 582-583.
134. Ongini, E., Fredholm, B.B.: Pharmacology of adenosine A<sub>2A</sub> receptors, *TIPS*, 17 (1996) 364-371.
135. Ostrom, R.S., Ehlert, F.J.: M<sub>2</sub> muscarinic receptor inhibition of agonist-induced cyclic adenosine monophosphate accumulation and relaxation in the guinea pig ileum, *J Pharmacol Exp Ther*, 280(1) (1997) 187-191.

136. Palmer, T.M., Poucher, S.M., Jacobson, K.A., Stiles, G.L.: <sup>125</sup>I-4-2-[7-Amino-2-(2-furyl){1,2,4}triazolo{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-yl-amino]ethylphenol, a high affinity antagonist radioligand selective for the A<sub>2a</sub> Adenosine Receptor, *Mol Pharmacol*, 48 (1995) 967-972.
137. Palmer, T.M., Stiles, G.L.: The new biology of adenosine receptors, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 69 (1994) 83-86.
138. Paulmichl M., Pfeilschifter J., Wöll E., Lang F.: Cellular mechanisms of ATP-induced hyperpolarisation in renal epitheloid MDCK-cells, *J Cell Physiol*, 147 (1991) 66-70.
139. Pearce B., S. Murphy, J. Jeremy, C. Morrow, P. Dandona: ATP-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilisation and prostanoid release from astrocytes: P<sub>2</sub>-purinergic receptors linked to phosphoinositide hydrolysis, *J. Neurochem.*, 52 (1989) 972-977.
140. Pearson, J. D., T. D. Carter: Effects of extracellular ATP on the release of vasoactive mediators from endothelium, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 44 (1990) 578-581.
141. Picano, E., Pogliani, M., Lattanzi, F., Distanti, A., L'Abbate, A.: Exercise capacity after acute aminophylline administration in angina pectoris, *Am. J. Cardiol.*, 63 (1989) 13-16.
142. Potter, E. K.: Neuropeptide Y as an autonomic neurotransmitter, *Pharmacol. Ther.*, 37 (1988) 270-273.
143. Rand M.J.: Nitrgergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 19 (1992) 145-148.
144. Rathbone M.P., Christjanson L., De Forge S., et al: Extracellular purine nucleosides stimulate cell division and morphogenesis: pathological and physiological complications, *Med Hypoth* 37 (1992) 229-234.
145. Redman, R.S., Silisky, E.M.: A Selective Adenosine Antagonist (8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin) Eliminates Both Neuromuskular Depression and the Action of Exogenous adenosine by an Effect on A<sub>1</sub> Receptors, *Mol-Pharmacol.*, 44(4) (1993)

835-839.

146. Reeves, J.J., Coates, J., Jarvis, J.E., Sheehan, M.J., Strong, P.: Characterisation of the adenosine receptor mediating contraction in rat colonic muscularis mucosae, *Br. J. Pharmacol*, 110(3) (1993) 1253-1255.
147. Remalingam, K., Snyder, G.H.: Selective disulfide formation in truncated apamin and sarafotoxin, *Biochemistry*, 32(41) (1993) 11157-11159.
148. Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M.: Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A<sub>3</sub>) adenosine receptor, *Prog. Neurobiol.*, 26 (1986) 198-201.
149. Rice, W. R., Singleton, F. M.: P<sub>2y</sub>-purinoceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilisation of intracellular calcium, *Br. J. Pharmacol.*, 91 (1987) 833-836.
150. Richardson, P. J., Brown, S. J.: ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminal, *J. Neurochem.*, 48 (1987) 626-630.
151. Rmoro, F., Frediani-Neto, E., Paiva, T.B., Paiva, A.C.: Role of NA<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> Exchange in the relaxant effect of sodium taurocholate on the guinea-pig ileum smooth muscle, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 348(3) (1993) 324-329.
152. Romert, P., Mikkelsen, H.B.: c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in the human small and large intestine, *Histochem Cell Biol*, 109(3) (1998) 196-199.
153. Saffrey, M.J., Hassal, C.J.S., Hoyle, C.H.V., Belai, A., Moss, J., Schmidt, H.H.H.W., Förstermann, U., Murad, F., Burnstock, G., Nitric oxide synthase and NADPH diaphorase activity in cultured myenteric neurones, *Neuro Report*, 3 (1992) 330-334.
154. Sato, K., Okajima, F., Kondo, Y.: Extracellular ATP stimulates three different receptor-signal transduction systems in FRTL-5 thyroid cells, *Biochem J*, 283 (1992) 279-283.
155. Sauve, R., Parent, L., Simmoneau, C., Roy, G.: External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K<sup>+</sup> channel in cultured bovine aortic endothelial cells, *Pfluegers Arch.*, 412 (1988) 479-482.

156. Saville, V.L., Maynard, K.I., Burnstock, G.: Neuropeptide Y potentiates purinergic as well as adrenergic responses of the rabbit ear artery, *Eur J Pharmacol*, 176 (1990) 115-119.
157. Schäfer, K., Saffrey, M.J., Burnstock, G.: Trophic actions of 2-chloroadenosine and bFGF on cultured myenteric neurones. *Neuro Report* 6 (1995) 936-939.
158. Seale, T.W., Abla, K.A., Shamim, M.T., Carney, J.M., Daly., J.W.: 3,7 Dimethyl- 1-propargylxanthine: A potent and selective in vivo antagonist of adenosine analogs, *Life Sci*, 43 (1988) 1671-1680.
159. Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A.: 1,3,8- and 1,3,7-substituted xanthines: relative potency as adenosine receptor antagonists at the frog neuromuscular junction, *Br. J. Pharmacol*, 96 (1989) 211-215.
160. Shimizu, H., Daly, J. W., Creveling, C. R.: A radioisotopic method for measuring the formation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in incubated slices of brain, *J. Neurochem.*, 16 (1969) 1614-1618.
161. Siddigi, S.M., Jacobson, K.A., Esker, J.L., Olah, M.E., Ji, X., Melman, N., Tiwari, K.N., Secrist, J.A., Schneller, S.W., Cristalli, G., Stiles, G.L., Johnson, C.R., Ijzerman, A.I.: Search for new Purine- and Ribose-modified Adenosine-analogues as selective agonists and antagonists at Adenosine receptors, *J. Med. Chem*, 38 (1995) 1172-1175.
162. Silinsky, E.M., Gerzanich, V.: On the excitatory effects of ATP and its role as a neurotransmitter in coeliac neurons of the guinea-pig, *J Physiol Lond*, 464 (1993) 208-212.
163. Smith, T.K., Bornstein, J.C., Furness, J.B.: Interactions between reflexes evoked by distension and mucosal stimulation. electrophysiological studies of guinea-pig ileum, *J Auton Nerv Syst*, 34(1) (1991) 69-75.
164. Smith, K.M., Robertson, W.J.: Synchronous movements of the longitudinal and circular muscle during peristalsis in the isolated guinea-pig distal colon, *J Phys*, 506(2) (1998) 562-565.

165. Sneddon, P., Burnstock, G.: ATP as a co-transmitter in rat tail artery, *Eur. J. Pharmacol.*, 100 (1984) 87-89.
166. Sneddon, P., Westfall, D. P.: Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens, *J. Physiol. (London)*, 347 (1984) 560-563, 578.
167. Soejima, O., Katsuragi, T., Furukawa, T.: Opposite modulation by muscarinic M1 and M3 receptors of acetylcholine release from guinea pig ileum as measured directly, *Eur J Pharmacol*, 249(1) (1993) 1-3.
168. Sollevi, A., Lagerkranser, M., Irestedt, L., Gordon, E., Lindquist, C.: Controlled hypotension with adenosine in cerebral aneurysm surgery, *Anesthesiology*, 61 (1984) 398-402.
169. Soltoff, S.P., McMillian, M.K., Talamo, B.R.: ATP activates a cation-permeable pathway in rat parotid acinar cells, *Am J Physiol*, 262 (1992) C936-939.
170. Suzuki, K., Ito, K.M., Minayoshi, Y., Suzuki, H., Asano, M., Ito, K.: Modification by charybdotoxin and apamin of spontaneous electrical and mechanical activity of the circular smooth muscle of the guinea-pig stomach, *Br J Pharmacol*, 109(3) (1993) 664-666.
171. Szurszewski, J.H.: Electrical basis for gastrointestinal motility, In: Johnson, L.R., (Hrsg.): *Physiology of the gastrointestinal tract*, Raven Press, New York, USA, (1987) 382-385.
172. Tatham, P. E. R., Cusack, N. J., Gomperts, B. D.: Characterisation of the ATP4-receptor that mediates permeabilisation of rat mast cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 147 (1988) 17-20.
173. Theobald, R. J.: Evidence against purinergic nerve fibres in the hypogastric nerves of the cat, *J. Auton. Pharmacol.*, 3 (1982) 175-178.
174. Trachte, G.T.: Angiotensin effects on vas deferens adrenergic and purinergic neurotransmission, *Eur J Pharmacol*, 146 (1988) 260-263.

175. Trachte, G. T.: The influence of prostaglandins on neurotransmission in the rabbit isolated vas deferens, *Prostaglandins*, 29 (1985) 54-58.
176. Trendelenburg, P.: Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperisaltik, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 81 (1917) 60-62.
177. Van Galen, P.L.M., Stiles, G.L., Michaels, G.S., Jacobson, K.A.: Adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors: Structure function relationships, *Med Res Rev*, 12(5) (1992) 466-470.
178. Vogalis, F., Goyal, R.K.: Activation of small conductance Ca(2+) dependent K<sup>+</sup> channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum, *J Physiol*, 502 (1997) 503-505.
179. Von Kugelgen, I., Kurz, K., Starke, K.: Axon terminal P<sub>2</sub>-purinoceptors in feedback control of sympathetic transmitter release, *Neuroscience*, 56(2) (1993) 262-265.
180. Weisbrodt, N.W.: Motility of the small intestine, In: Johnson, L.R., (Hrsg.): *Physiology of the gastrointestinal tract*, Raven Press, New York, USA, (1987) 654-656.
181. Wesley, R. C., Lerman, B. B., Di Marco, J. P., Berneand, R. M., Belardinelli, L.: Mechanism of atropine-resistant atrioventricular block during inferior myocardial infarction: possible role of adenosine, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 8 (1986) 1232-1233.
182. White, T. D.: Role of adenine compounds in autonomic neurotransmission, *Pharmacol. Ther.*, 38 (1988) 164-167.
183. White, T.D., Leslie, R.A.: Depolarization-induced release of adenosine 5'-triphosphate from isolated varicosities derived from the myenteric plexus of the guinea pig small intestine, *J Neurosci*, 2 (1982) 206-215.
184. Williams, M.: *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, H. Y. Meltzer, Ed. (1987) 289-301, Raven Press New York NY.
185. Williams, M.: Purinergic Drugs: oppurtunities in the 1990s, *Drug Dev Res* 28 (1993) 436-439.

186. Williams, M., Braunwalder, A., Erickson, T.J.: Evaluation of the binding of the A1-selective adenosine radioligand, cyclopentyladenosine (CPA), to rat brain tissue, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 332 (1986) 179-182.
187. Yang, C.M., Chen, F.F., Sung, T.C., Hsu, H.F., WU, D.: Pharmacological characterisation of muscarinic receptors in neonatal rat cardiomyocytes, *Am J Physiol*, 265 (1993) 665-667.
188. Yokoyama, S., North, R.A.: Electrical activity of longitudinal and circular muscle during peristalsis, *Am J Physiol*, 244 (1983) G83-88.
189. Yokoyama, S., Ozaki, T.: Effects of gut distension on Auerbach's plexus and intestine muscle, *Jpn. J. Physiol.*, 30 (1980) 150-154.
190. Zhou, Q.Y., Li, C., Olah, M.E., Johnson, R.A., Stiles, G.L., Civelli, O.: Molecular cloning and characterisation of an adenosine receptor: the A<sub>3</sub> adenosine receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89 (1992) 7430-7434.

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abb.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues	7
Abb.2: Graphische Darstellung des Einflusses von Pirenzepin	12

( $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-4}\text{M}$  und  $3 \times 10^{-4}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

- Abb.3: Graphische Darstellung des Einflusses von Methoctramin ( $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  und  $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 14
- Abb.4: Graphische Darstellung des Einflusses von Apamin ( $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$  und  $10^{-7}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 18
- Abb.5: Graphische Darstellung des Einflusses von CPA ( $10^{-14}\text{M}$ ,  $10^{-12}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$  und  $10^{-8}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 20
- Abb.6: Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von DPCPX ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes. 22
- Abb.7: Graphische Darstellung des Einflusses von DPCPX ( $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  und  $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 23
- Abb.8: Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von CPA ( $10^{-10}\text{M}$ ) und nachfolgender DPCPX-Zugabe ( $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes. 25
- Abb.9: Graphische Darstellung des Einflusses von CPA ( $10^{-14}\text{M}$ ,  $10^{-12}\text{M}$ ) und anschließender DMPX- ( $10^{-6}\text{M}$ ) und DPCPX- ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ) Zugabe auf die Kontraktionskraft des Ileumseg- 29

menten nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms).

- Abb.10: Graphische Darstellung des Einflusses von CPCA ( $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$  und  $10^{-6}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 32
- Abb.11: Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von CPCA ( $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes. 33
- Abb.12: Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von DMPX ( $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes. 35
- Abb.13: Graphische Darstellung des Einflusses von DMPX ( $10^{-15}\text{M}$ ,  $10^{-13}\text{M}$ ,  $10^{-11}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$  und  $10^{-7}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 36
- Abb.14: Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von CPCA ( $10^{-6}\text{M}$ ) und nachfolgender DMPX-Zugabe ( $10^{-5}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes. 38
- Abb.15: Graphische Darstellung des Einflusses von CPCA ( $10^{-6}\text{M}$ ) und anschließender DPCPX- ( $10^{-5}\text{M}$ )- und DMPX- ( $10^{-5}\text{M}$ ) Zugabe auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 41
- Abb.16: Graphische Darstellung des Einflusses von CPCA ( $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ ) und anschließender Apamin- ( $10^{-7}\text{M}$ )- Zugabe auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 43
- Abb.17: Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von alpha-beta- 45

methylene-ATP ( $10^{-5}\text{M}$  und  $10^{-4}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes.

- Abb.18: Repräsentative Aufzeichnung des Einflusses von reactive blue 2 ( $10^{-5}\text{M}$  und  $10^{-4}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileum nach elektrischer Feldstimulation 2cm (oben) bzw. 4cm (unten) oral des Stimulationsortes. 47
- Abb.19: Graphische Darstellung des Einflusses von reactive blue 2 ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$  und  $10^{-4}\text{M}$ ) auf die Kontraktionskraft des Ileumsegmentes nach elektrischer Feldstimulation (20V, 3Hz, 1ms). 48
- Abb.20: Schematische Darstellung eines Adenosinrezeptors 86
- 
- Tab.1: Intraluminaler Druck (Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Pirenzepin (M) (n = 11) 11
- Tab.2: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Methoctramin (M) (n = 9) 13
- Tab.3: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in  $\text{mm}^2$ ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation 15

(3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Hexahydrosiladifenidol (M) (n = 15)

Tab.4:	Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) bei einer Verdünnungsreihe mit DMSO (n = 11)	16
Tab. 5:	Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrischen Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von Apamin (M) (n = 15)	17
Tab.6:	Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von N6-Cyclopentyladenosin (M) (n = 12)	19
Tab.7:	Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M) (n = 11)	21
Tab.8:	Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von N6-Cyclopentyladenosin (M) und 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M) (n = 6)	24
Tab.9:	Frequenz der Eigenkontraktionen (Anzahl pro Minute) ohne elektrische Feldstimulation vor und nach Zugabe von N6-Cyclopentyladenosin (M) und 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M)	26

(n = 6)

Tab.10: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von N <sup>6</sup> -Cyclopentyl-adenosin (M), 3,7-Dimethyl-1-propargyl-xanthine (M) und 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (M) (n = 6)	28
Tab.11: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von (NCyclopropyl)-carboxamidoadenosine (M) (n = 8)	31
Tab.12: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.M. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (M) (n = 10)	34
Tab.13: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 5'-(NCyclopropyl)-carboxamidoadenosine (M) und 3,7-Di-methyl-1-propargyl-xanthine (M) (n = 6)	37
Tab.14: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 5'-(NCyclopropyl)-carboxamidoadenosine (M), 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropyl-xanthine und 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine (M) (n = 7)	40
Tab.15: Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des	42

	Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von 5'-(NCyclopropyl)-carboxamidoadenosine (M) und Apamin (M) (n = 7)	
Tab.16:	Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von $\alpha,\beta$ -Methylenadenosine-5'-Triphosphat (M) und Apamin (M) (n = 9)	44
Tab.17:	Intraluminaler Druck (Mittelwert und S.D. der Fläche unter der Kurve in mm <sup>2</sup> ) und relative Kontraktionsstärke (in % des Kontrollwertes) als Antwort auf die elektrische Feldstimulation (3 Hz, 20 V, 1 ms) vor und nach Zugabe von reactive blue 2 (n = 8)	46
Tab.18:	Adenosinrezeptoren und ihre Eigenschaften (Tabelle gemäß Fredholm; (Fredolm, 1996, S.80)).	71

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen ganz herzlich danken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt meinen Lehrern Herrn Professor Dr. med. M. Classen und Herrn Professor Dr. med. V. Schusdziarra für die Bereitstellung des Themas und für die Schaffung des für die wissenschaftliche Arbeit notwendigen Umfeldes.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Hans-Dieter Allescher, der mir bis zur Fertigstellung der Arbeit mit seiner hervorragenden Betreuung stets freundschaftlich und hilfreich zur Seite stand.

## **10. Lebenslauf**

Name	Dora Triché, geb. Schernhardt
Geburtsdatum	10.05.1969
Geburtsort	Budapest
Familienstand	verheiratet
1974 - 1980	Grundschule in Budapest, Alger, Bayerisch Gmain
1980 - 1989	Karls gymnasium Bad Reichenhall
Mai 1989	Abitur
Juni 1989	Erwerb des Stipendiums für Hochbegabte des Landes Bayern
10/89 - 3/90	Universität Saarbrücken
4/90 - 10/91	Universität Regensburg

9/91	Physikum
11/91 - 6/96	Technische Universität München
8/92	1. Staatsexamen
3/95	2. Staatsexamen
5/96	3. Staatsexamen
1993	Beginn der experimentellen und theoretischen Arbeit an der vorliegenden Dissertation
5/96 - 5/97	Ärztin in Praktikum an der Universitätsklinik Saint-Antoine in Paris; Innere Abteilung
5/97 - 11/97	Ärztin in Praktikum im Stadt- und Kreiskrankenhaus Ansbach; Innere Abteilung
seit 11/97	Assistenzärztin an der 3. Medizinischen Klinik, Klinikum Nürnberg Nord