

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die segmentspezifischen Wirkungen  
von Adrenalin auf den Ionentransport  
am Colon der Ratte**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Silke Leona Hörger**

Gießen 1999

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

**Die segmentspezifischen Wirkungen  
von Adrenalin auf den Ionentransport  
am Colon der Ratte**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Silke Leona Hörger**

Tierärztin aus

Ludwigshafen am Rhein

Gießen 1999

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm Schoner

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Diener
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Kornelia Ziegler

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1999

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungen</b>	<b>I</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Adrenalin	1
1.1.1 Biologische Grundlagen	1
1.1.2 Adrenerge Rezeptoren	3
1.1.3 Wirkungen des Adrenalins	6
1.2 Das Colon der Ratte	7
1.2.1 Anatomie und Histologie	7
1.2.2 Ionen transport im proximalen und distalen Rattencolon	10
1.2.3 Steuerung des Ionen transports	13
1.3 Fragestellung	16
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Elektrolytlösungen	17
2.2 Versuchstiere	17
2.3 Gewebepreparation	18
2.4 Ussing-Kammer	18
2.5 Elektrische Messungen	20
2.6 Messungen unidirektionaler Ionenflüsse	23
2.6.1 K <sup>+</sup> -Flüsse	23
2.6.2 Na <sup>+</sup> - und Cl <sup>-</sup> -Flüsse	24
2.6.3 Sekretorischer HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Fluß	25
2.7 Chemikalien	27
2.8 Auswertung	28

	Seite
<b>III. Resultate</b>	<b>29</b>
3.1 Die Wirkungen von Adrenalin auf die elektrischen Parameter	29
3.1.1 Segmentabhängigkeit	29
3.1.2 Zeitlicher Verlauf der I <sub>sc</sub> -Änderung	30
3.1.3 Variabilität	33
3.1.4 Konzentrationsabhängigkeit	33
3.1.5 Desensitivierung	34
3.2 Ionale Abhängigkeit des Adrenalin-Effekts	36
3.2.1 Anionensubstitutionsversuche und Wirkung von Transportinhibitoren	36
3.2.2 Messung unidirektionaler K <sup>+</sup> -Flüsse	40
3.2.3 Messung unidirektionaler Na <sup>+</sup> - und Cl <sup>-</sup> -Flüsse	42
3.2.4 Messung sekretorischer HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Flüsse	45
3.3 Beteiligung subepithelialer Strukturen	45
3.4 Differenzierung der beteiligten adrenergen Rezeptoren	48
<b>IV. Diskussion</b>	<b>53</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>Summary</b>	<b>66</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>Danksagung</b>	<b>75</b>

## Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
Gt	totale Gewebeleitfähigkeit
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
Isc	Kurzschlußstrom
J <sub>ms</sub>	unidirektionaler Ionenfluß von mucosal nach serosal
J <sub>Na/Cl/Rb/HCO<sub>3</sub></sub>	Ionenfluß von Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Rb <sup>+</sup> oder HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
J <sub>net</sub>	Netto-Ionenfluß
J <sub>R<sub>net</sub></sub>	Residualionenfluß
J <sub>sm</sub>	unidirektionaler Ionenfluß von serosal nach mucosal
μEq	Mikro-Equivalent (1 μEq·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> = 26,9 μA·cm <sup>-2</sup> )
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pd	Potentialdifferenz
r	Korrelationskoeffizient
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid

# **I. Einleitung**

## **1.1 Adrenalin**

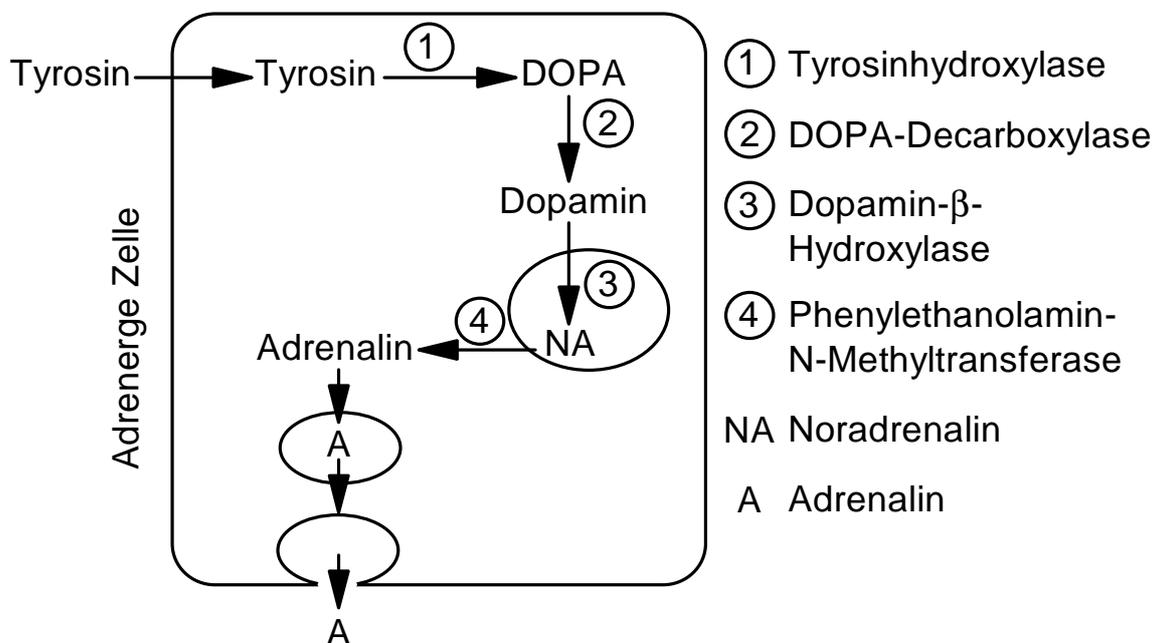
### *1.1.1 Biologische Grundlagen*

Adrenalin zählt zu den körpereigenen Catecholaminen, neben Noradrenalin und Dopamin (Starke und Palm, 1996). Es fungiert im Organismus als Neurotransmitter und als ergotropes Hormon (Dudel, 1995a); deswegen wird auch die Bezeichnung „Neurohormon“ verwendet (Burks, 1994). Als Transmitter kommt es ausschließlich in Nervenzellen des zentralen Nervensystems vor, die größtenteils in der Medulla oblongata liegen. Als Hormon wird es vom Nebennierenmark ausgeschüttet (Starke, 1996a). Synthese, Speicherung und Freisetzung von Adrenalin finden in den zentralen Neuronen oder in den sogenannten chromaffinen Zellen oder Chromaffinocyten des Nebennierenmarks statt. Der Name stammt von der hohen Affinität der zytoplasmatischen Granula dieser Zellen zu Chromsalzen, mit denen sie sich anfärben lassen. Diese von einer einfachen Membran begrenzten Granula sind Träger der Markhormone Adrenalin und Noradrenalin und werden deshalb auch als Catecholamingranula bezeichnet (Döcke und Kemper, 1994). Dabei wird Adrenalin in anderen Zellen synthetisiert als Noradrenalin. Morphologisch betrachtet sind diese Zellen des Nebennierenmarks den postganglionären sympathischen Neuronen homolog (Lefkowitz et al., 1990; Jänig, 1995). Das Nebennierenmark entspricht damit einem modifizierten sympathischen Ganglion, daher das Synonym „Paraganglion suprarenale“ (Döcke und Kemper, 1994).

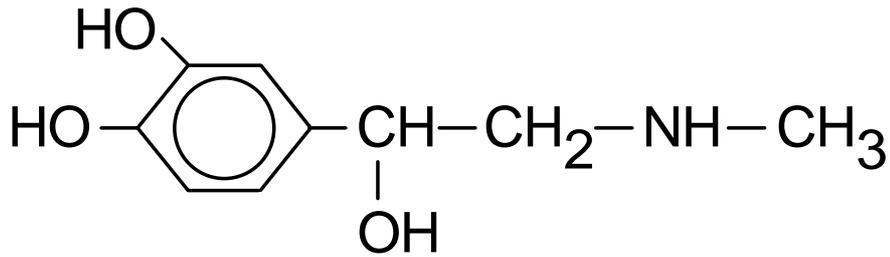
Es gibt zwei verschiedene Mechanismen der Regulation der Biosynthese von Nebennierenmark-Catecholaminen: Zum einen gibt es eine sympathische Innervation durch präganglionäre, cholinerge Neurone (Lefkowitz et al., 1990). Über deren Stimulierung wird die Aktivität der an der Synthese beteiligten Enzyme gesteigert und die Freisetzung der Hormone induziert. Diese Wirkung

wird offenbar über Cotransmitter des Acetylcholins in den präganglionären Nervenendigungen moduliert, v. a. Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), Substanz P und Enkephaline. Das vermittelnde Signal stellt wahrscheinlich ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über Einstrom durch Calcium-Kanäle dar. Daneben üben auch Glucocorticoide und ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) einen steigernden Einfluß auf die Adrenalin-/Noradrenalin-Synthese im Nebennierenmark aus. Zur kurzfristigen Regulation gibt es einen negativen feed back-Mechanismus durch freie Catecholamine auf die eigene Synthese (Döcke und Kemper, 1994).

Ausgangspunkt des Adrenalin-Zusammenbaus ist die Aminosäure Tyrosin. Sie wird aus dem Extrazellulärraum in die synthetisierenden Nerven- oder Nebennierenmarkzellen aufgenommen. Dort katalysieren verschiedene zytoplasmatische bzw. vesikelständige Enzyme über mehrere Zwischenprodukte die Bildung des sekundären Amins Adrenalin (Abb. I.1.A und I.1.B; Starke, 1996a).



**Abb. I.1.A:** Schematische Darstellung der Synthese, Speicherung und Freisetzung von Adrenalin (modifiziert nach Burks, 1994).



**Abb. I.1.B:** Strukturformel von Adrenalin.

Die Freisetzung des Adrenalins aus den Chromaffinozyten wird getriggert über cholinerge Synapsen präganglionärer Neurone aus dem Thorakalmark. Die Aktivierung des Nebennierenmarks erfolgt v. a. bei physischem oder psychischem Streß über den Hypothalamus und das limbische System (Jänig, 1995). Ein ankommendes Aktionspotential induziert, genau wie bei den adrenergen Neuronen, einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Die so erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration setzt die Fusion der Vesikelmembran mit der neuronalen bzw. der Zellmembran über sog. „docking proteins“ in Gang. Diesem Schritt folgt die Exozytose der Speichersubstanz in den synaptischen Spalt bzw. den Extrazellulärraum um die Chromaffinozyten.

Dabei bestehen die aus dem Nebennierenmark ausgeschütteten Catecholamine zu ca. 80% aus Adrenalin und zu ca. 20% aus Noradrenalin (Lefkowitz et al., 1990).

### *1.1.2 Adrenerge Rezeptoren*

Die Wirkung von Adrenalin wird über adrenerge Rezeptoren auf den Zielzellen vermittelt. Nach der Freisetzung diffundiert Adrenalin zu den Rezeptoren, stimuliert diese während der reversiblen Agonist-Rezeptor-Bindung und löst nach Aktivierung intrazellulärer Vermittlungssysteme, zu denen z. B. die Adenylatcyclase, Phosphoinositolbisphosphat und Ionenkanäle zählen, schließlich seine biologische Antwort aus (Burks, 1994).

Bei den Adrenozeptoren handelt es sich um mehrfach membrangängige Peptidketten, die an der Innenseite der Cytoplasmamembran an ein G-Protein (= Guaninnucleotid-bindendes Protein) gekoppelt sind (Meyer, 1994). Die Bindung des Agonisten an den extrazellulären Rezeptor-Bereich führt eine Konformationsänderung im Rezeptormolekül herbei (Burks, 1994). Das Signal wird von dem G-Protein aufgenommen und über die second messenger-Systeme an die Effektoren weitergeleitet (Fichtl et al., 1996). Diese Zielproteine - Enzyme oder Ionenkanäle der Zielzelle - sind schließlich die Träger der biologischen Wirkung des Agonisten am Rezeptor, und ihre Aktivität wird über die G-Proteine reguliert (Burks, 1994). Da jedes aktivierte G-Protein mehrere Zielproteine beeinflussen kann, stellt dieser Transduktionsmechanismus eine chemische Multiplikation jedes Signals dar, das vom Rezeptor ausgeht (Fichtl et al., 1996).

Die klassische Einteilung der Adrenozeptoren unterscheidet, nach ihrer pharmakologischen Empfindlichkeit, einen  $\alpha$ - und einen  $\beta$ -Rezeptortyp und ihre jeweiligen Subtypen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  (Lefkowitz et al., 1990). Eine modernere Einteilung klassifiziert 3 Haupttypen:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta$ . Grundlage dieser neueren Unterteilung sind zum einen die 3 verschiedenen second messenger-Systeme, die diesen Rezeptortypen jeweils nachgeschaltet sind. Zum anderen sprechen neuere Erkenntnisse über die Aminosäure-Sequenzen der Rezeptormoleküle für diese Dreiteilung (Bylund et al., 1994). Jede dieser 3 Hauptgruppen läßt sich weiter in pharmakologisch bzw. molekularbiologisch definierte Subtypen differenzieren.

$\beta$ -Rezeptoren aktivieren über ein stimulatorisches G- (=  $G_s$ -) Protein die Adenylatcyclase. Über cAMP und Proteinkinase A werden schließlich Zielproteine phosphoryliert, d. h. ihrerseits aktiviert. Dies kann u. a. zu einer Öffnung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen führen. Daneben kann durch gesteigerte intrazelluläre Rückspeicherung die Calcium-Konzentration sinken, was z. B. ein Erschlaffen glatter Muskulatur auslöst (Lefkowitz et al., 1994).

$\beta_1$ -Rezeptoren sprechen auf Adrenalin und Noradrenalin gleichermaßen an.  $\beta_2$ -Rezeptoren hingegen sind für Adrenalin 100fach empfindlicher als für Noradrenalin. Präsynaptisch stellen sie einen positiven feed back-Mechanismus dar, über den die Catecholamin-Ausschüttung gesteigert wird (Lefkowitz et al., 1990). Seit kürzerer Zeit ist die Existenz eines dritten  $\beta$ -Rezeptor-Subtyps bekannt. Da er auf die verfügbaren Betablocker nicht anspricht, wurde er auch als „atypischer“  $\beta$ -Rezeptor bezeichnet (Burks, 1994). An diesem  $\beta_3$ -Rezeptor ist Noradrenalin etwa 10mal wirksamer als Adrenalin (Lefkowitz et al., 1990).

$\alpha_1$ -Rezeptoren sind an ein bislang nicht näher definiertes G-Protein gekoppelt. Über Aktivierung der Phospholipase C wird Phosphatidylinositol-bisphosphat in Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol gespalten. IP<sub>3</sub> mobilisiert Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern. In vielen Geweben kommt noch ein Einstrom von extrazellulärem Calcium hinzu; ein Resultat ist u. a. die Kontraktion glatter Muskulatur. Diacylglycerol und Calciumionen aktivieren Proteinkinasen, die wiederum Zielproteine phosphorylieren (Lefkowitz et al., 1990). Enterale Neurone können über  $\alpha_1$ -Rezeptoren gehemmt werden, indem das freigesetzte Ca<sup>2+</sup> Kalium-Kanäle öffnet und so die neuronale Membran hyperpolarisiert wird (Burks, 1994).

Über das inhibitorische G- (= G<sub>i</sub>-) Protein des  $\alpha_2$ -Rezeptors wird die Adenylatcyclase deaktiviert; der intrazelluläre cAMP-Spiegel und damit die Aktivität der Proteinkinase A sinken. Ist der Rezeptor präsynaptisch lokalisiert, werden membranständige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle gehemmt und die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit erhöht. Daraus resultiert eine Membranhyperpolarisation. Auf diesem Weg kann der Transmitter als negativer feed back-Mechanismus seine eigene Ausschüttung mindern oder auch die Acetylcholin-Freisetzung aus cholinergen Nervenendigungen reduzieren (Lefkowitz et al., 1990). Neben diesen präsynaptischen Auto- bzw. Heterorezeptoren gibt es  $\alpha_2$ -Rezeptoren auch in postsynaptischen Membranen. Hierüber werden mittels eines nicht genau geklärten Mechanismus membranäre Ca<sup>2+</sup>-Kanäle geöffnet und, ähnlich den

$\alpha_1$ -Rezeptoren, die intrazelluläre Calcium-Konzentration gesteigert (Bylund et al., 1994). Solche postsynaptischen  $\alpha_2$ -Rezeptoren sind u. a. auf enteralen Epithelzellen nachgewiesen worden (Burks, 1994).

Diese second messenger-Systeme sind die am besten untersuchten, aber nicht die einzigen Mechanismen der Signaltransduktion nach Adrenozeptor-Aktivierung. Abhängig vom jeweiligen Gewebetyp kommt z. B. auch die direkte oder indirekte Beeinflussung von Ionenkanälen oder -austauschern oder von verschiedenen Phospholipasen in Frage (Bylund et al., 1994).

Die Beendigung der Wirkung wird eingeleitet durch den Abtransport des Adrenalins aus dem synaptischen Spalt bzw. aus der Umgebung des Rezeptors (Dudel, 1995b). Die Substanz wird entweder über einen aktiven, Cocain-sensitiven Mechanismus in die freisetzende Zelle wiederaufgenommen oder diffundiert in die Effektorzelle (Burks, 1994). Sie unterliegt dort der Metabolisierung durch die Enzyme Catechol-O-Methyltransferase und Monoaminoxidase oder wird über einen hochspezifischen Carrier in die Catecholamingranula rückgespeichert (Döcke und Kemper, 1994). Letzterer Mechanismus überwiegt im Magen-Darm-Trakt (Burks, 1994).

### *1.1.3 Wirkungen des Adrenalins*

Adrenalin übt im Gesamtorganismus die allgemein bekannten Wirkungen u. a. auf das Herz, auf die glatte Muskulatur in Atemwegen, Gefäßsystem, Magen-Darm-Trakt, Genitaltrakt und auf den Stoffwechsel aus.

Am Darm, dem hier untersuchten Organsystem, beeinflusst Adrenalin neben der glatten Muskulatur auch die Ionentransportverhältnisse der Mucosa. Frühe Untersuchungen ließen auf proresorptive Effekte der Substanz schließen: Am Ileum des Kaninchens wurden in vitro die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Resorption stimuliert und daneben die basale wie auch cAMP-stimulierte  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion gehemmt (Field und McColl, 1973). Weiterführende Versuche wiesen auf eine Wirkungsvermittlung über  $\alpha_2$ -Rezeptoren direkt auf den Enterozyten hin

(Chang et al., 1982). Am Dünndarm des Meerschweinchens schien der resorptionsfördernde Effekt indirekt, über eine Hemmung spontan aktiver sekretomotorischer Neurone des Plexus submucosus durch Adrenalin, induziert zu werden (Keast et al., 1986). Diese Einstufung des Adrenalins als proresorptives Agens wurde durch Versuche am Colon der Ratte anscheinend bestätigt. Racusen und Binder fanden 1979 eine Steigerung der Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Resorption.

Später zeigte sich jedoch die ausgeprägte Spezies- und Segmentspezifität der Adrenalin-Antwort. Am Dickdarm des Kaninchens wurde ein Anstieg der K<sup>+</sup>-Sekretion ohne Änderung der Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Nettoflüsse gefunden (Halm, 1984). Hier waren  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, lokalisiert auf den Enterozyten, involviert (Smith und McCabe, 1986). Ähnliche Befunde wurden am distalen Colon des Meerschweinchens erhoben (Rechkemmer et al., 1996).

Interessanterweise beschränkt sich der sekretionsfördernde Einfluß von Adrenalin und auch Noradrenalin offenbar auf Kaliumionen, im Gegensatz zu verschiedenen bekannten Sekretagoga, die zugleich K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Sekretion steigern, wie z. B. Prostaglandin E<sub>2</sub>, Forskolin oder Cholera-Toxin (Rechkemmer et al., 1996; Field et al., 1975).

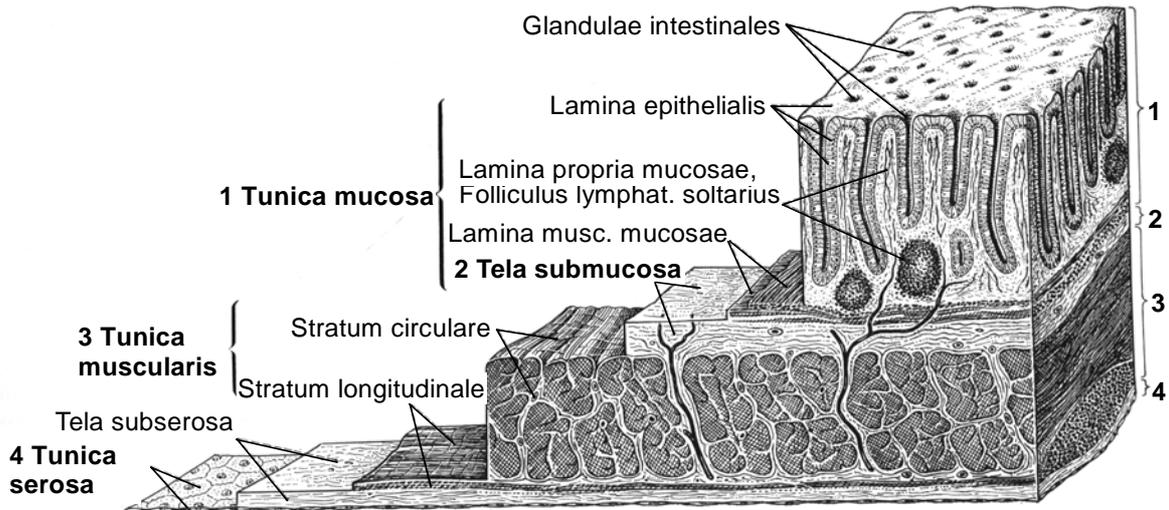
## **1.2 Das Colon der Ratte**

### *1.2.1 Anatomie und Histologie*

Das Colon der Ratte, an dem die vorliegenden Versuche durchgeführt wurden, läßt sich makroskopisch in 3 Abschnitte gliedern. Das proximale Colon ist durch eine charakteristische, schräge Schleimhautfältelung gekennzeichnet, die eine palmlätterartige Musterung ergibt. Es geht in die große Colonflexur über, die cranial an Leber und Magen stößt. Die große Flexur und das sich anschließende distale Colon besitzen eine längs gefältelte Mucosa. Den colorectalen Übergang markiert ein großer Lymphknoten in der Darmwand 3 -

3,5 cm vor dem Anus. Lymphoide Plaques liegen gleichmäßig im Colon verteilt (nach Olds und Olds, 1984; Lindström et al., 1979).

Die Darmwand ist aus mehreren konzentrischen Schichten aufgebaut. Außen wird das Colon von der Tunica serosa umschlossen. Die äußerste Begrenzung aus Peritonealzellen deckt die Tela subserosa aus Binde- und Fettgewebe ab. Nach innen schließt sich die Tunica muscularis mit einer externen, longitudinalen und einer internen, circulären Lage glatter Muskulatur an. Zwischen diesen beiden Schichten liegen die Ganglionzellen des Plexus myentericus (Auerbach-Plexus). Darauf folgt die Tela submucosa. In ihrem lockeren Bindegewebe sind Blut- und Lymphgefäße, lymphatisches Gewebe und neuronale Strukturen, der Plexus submucosus (Meissner-Plexus), eingebettet. Die äußere Begrenzung der Tunica mucosa, der eigentlichen Darmschleimhaut, wird von der Lamina muscularis mucosae gebildet. Subepithelial schließt sich die Lamina propria an, die hauptsächlich aus Bindegewebszellen besteht, in die Blutgefäße, Lymphfollikel (Folliculi lymphatici solitarii) und zahlreiche Immunzellen eingelagert sind. Die Oberflächenschicht der Mucosa, Lamina epithelialis, ist zusammengesetzt aus Becherzellen zur Schleimproduktion und aus hochprismatischen Zylinderepithelzellen, den Enterozyten (Abb. I.2). Die Mucosa des Colons ist zottenlos und bildet dicht nebeneinanderstehende Krypten (Glandulae intestinales). Morphologische Besonderheiten des proximalen Segments sind die noch schmalen, höheren Epithelzellen, die ungewöhnlich großen Becherzellen mit negativer PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion zum Nachweis von (Muco-)Polysacchariden, Muco- und Glycoproteiden durch Rotfärbung) sowie die kurzen, an der Basis leicht verästelten Krypten (nach Leonhardt, 1985; Lindström et al., 1979).



**Abb. I.2:** Schematische Darstellung der Colon-Wand, Lupenvergrößerung (nach Sobotta und Becher, 1972).

Die Epithelzellen besitzen eine polare Struktur. Die der Blutseite zugewandte Plasmamembran wird als basolaterale Membran bezeichnet. Die seitlichen Bereiche der basolateralen Membranen, die lateralen Zellmembranen, begrenzen die Interzellularspalten. Die funktionelle Außenseite des Epithels wird von der apicalen Membran abgeschlossen, die am Colon mit Microvilli zur Oberflächenvergrößerung ausgestattet ist, also eine Bürstensaummembran bildet (Fromm und Hierholzer, 1995).

Eine wichtige Aufgabe des Epithels, neben der Transportfunktion, ist die Bildung einer Barriere zwischen Außenwelt und Körperinnerem. Zu diesem Zweck sind die einzelnen Enterozyten eng miteinander verbunden (Alberts et al., 1995). Im Epithel kommen drei Arten von Zell-Zell-Verbindungen vor: Die Konnexone oder gap junctions ermöglichen die Passage elektrischer oder chemischer Signale von Zelle zu Zelle. Die Desmosomen oder intermediate junctions (= Zonulae adhaerentes) stellen den mechanischen Zusammenhalt im epithelialen Zellverband her. Die Schlußleisten oder tight junctions (= Zonulae occludentes) dienen zum einen der Abdichtung der Intermediärspalten. Sie verhindern unkontrollierte Diffusionsvorgänge zwischen Körperinnerem und

Darminhalt, wie die Rückdiffusion resorbierter Moleküle in das Darmlumen. Zum anderen halten sie die Transportproteine der apicalen und der basolateralen Zellmembranen voneinander getrennt, was erst einen gerichteten Stofftransport durch das Epithel ermöglicht (Alberts et al., 1995; Fromm und Hierholzer, 1995).

### *1.2.2 Ionentransport im proximalen und distalen Rattencolon*

Wesentliche Funktionen des Darms bestehen in der Aufnahme von Nährstoffen und Wasser, in der Abgabe von Ausscheidungsprodukten und in der Beteiligung an der Regulation des Elektrolythaushalts im Körper. Dem Ionenaustausch durch das Epithel hindurch stehen die apicale und die basolaterale Zellmembran entgegen, die aufgrund ihres lipophilen Charakters undurchlässig für geladene und damit hydrophile Teilchen sind. Einerseits ermöglicht dies den Aufbau und die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten gelöster Teilchen zwischen Zellinnerem und Extrazellulärraum. So kann Energie in Form von elektrochemischen Gradienten in der Zelle gespeichert werden, die als treibende Kraft für weitere Austausch- und Transportprozesse dient. Andererseits entsteht dadurch die Notwendigkeit von Transportmechanismen für bestimmte hydrophile Partikel durch die Membranen hindurch.

Zu diesem Zweck sind in die Membranen Transport- und Kanalproteine integriert. Transporter besitzen spezifische Bindungsstellen für ihr Substrat und verschieben dieses über eine Reihe von Konformationsänderungen von einer Membranseite auf die andere. Kanäle ermöglichen durch Öffnen und Schließen einen kontrollierten, passiven Durchtritt von Ionen durch die Membran (Alberts et al., 1995). Dabei wird ein Transport aus dem Darmlumen zur Blutseite, also von mucosal (apical) nach serosal (basolateral), als Resorption, in umgekehrter Richtung als Sekretion bezeichnet. Der transepitheliale Transport setzt sich aus

transzellulären und parazellulären Stoffbewegungen zusammen (Fromm und Hierholzer, 1995).

Eine zentrale Rolle im Ionenaustausch der Zelle nimmt die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der basolateralen Zellmembran ein. Diese Pumpe bringt unter ATP-Verbrauch 2 Kalium-Ionen in die Zelle hinein, während sie gleichzeitig 3 Natrium-Ionen aus der Zelle entfernt (Abb. I.3; Alberts et al., 1995). Beide Aktionen laufen entgegen den herrschenden Konzentrationsgradienten durch den hohen  $\text{K}^+$ - und geringen  $\text{Na}^+$ -Gehalt im Zellinneren ab (Kashgarian, 1980). Außerdem ist das innen negative Membranpotential dem  $\text{Na}^+$ -Auswärtstransport entgegengerichtet. Die Pumpe arbeitet selbst elektrogen und trägt so einen Teil zum Ruhe-Membranpotential bei. Der von der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe erzeugte elektrochemische Gradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum dient als treibende Kraft für eine Reihe weiterer Ionenbewegungen (Alberts et al., 1995). Daran sind die  $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase, der  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ - und der  $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ -Austauscher, der basolaterale  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2 Cl}^-$ -Cotransporter sowie  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle beteiligt (Alberts et al., 1995; Fromm und Hierholzer, 1995).

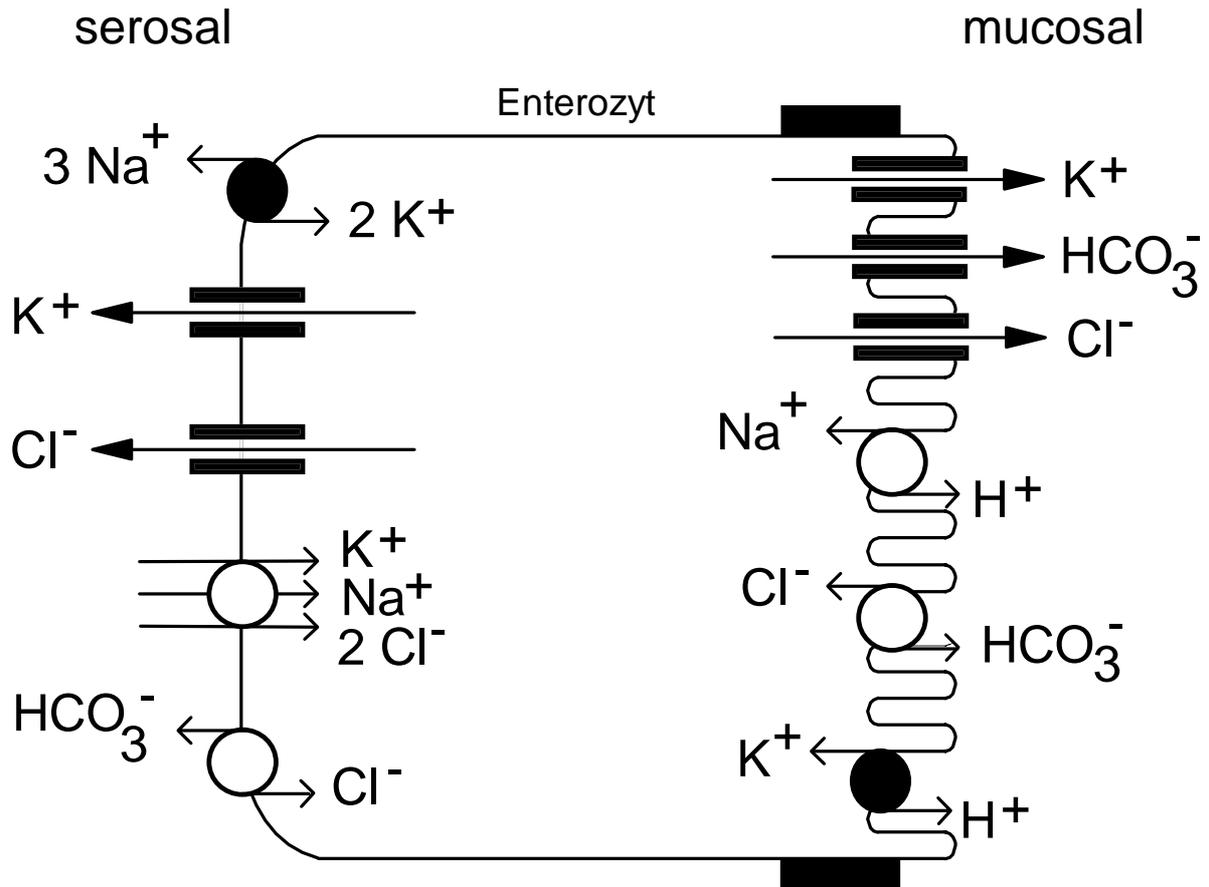
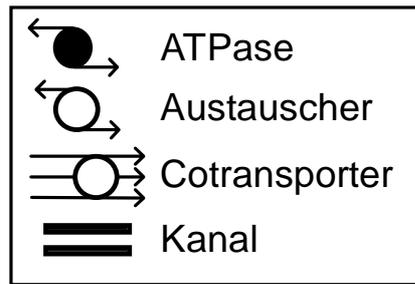
Im Colon finden sowohl eine aktive  $\text{K}^+$ -Resorption als auch eine aktive  $\text{K}^+$ -Sekretion statt. Der unidirektionale Mucosa-nach-Serosa-Transport kommt durch Kalium-Aufnahme via  $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der apicalen Membran und Kalium-Austritt durch basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle zustande (Diener et al., 1996; Schultheiß und Diener, 1997). Das proximale Segment weist nur ca. 20% der  $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase-Aktivität der distalen Colonmucosa auf (Del Castillo et al., 1991). Doch sowohl die  $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase-mRNA als auch das -Protein sind auch in der apicalen Membran des proximalen Rattencolons nachgewiesen (Sangan et al., 1997). Der sekretorische Fluß setzt sich aus basolateraler  $\text{K}^+$ -Aufnahme mittels der elektrogenen  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe und dem elektroneutralen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2 Cl}^-$ -Cotransporter und einem Austritt durch apicale  $\text{K}^+$ -Kanäle zusammen (Diener et al., 1996). Daneben erfolgt ein  $\text{K}^+$ -„Recycling“, indem aktiv aufgenommenes Kalium die Zelle passiv über benachbarte  $\text{K}^+$ -Kanäle derselben

Membran wieder verläßt (Binder und Sandle, 1994; Schultheiß und Diener, 1997).

$\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  werden über einen elektroneutralen Prozeß resorbiert (Binder und Sandle, 1994). Im distalen Segment werden in der apicalen Membran parallel Natrium gegen Protonen und Chlorid gegen Bicarbonat ausgetauscht (Nobles et al., 1991).  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  stammen zum großen Teil aus dem zelleigenen  $\text{CO}_2$ -Stoffwechsel ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ; Frizzell et al., 1976). Basolateral verlassen Chlorionen die Zelle durch  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (Diener et al., 1992); Natrium wird von der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase aus der Zelle gebracht. Proximal ist in der apicalen Membran lediglich der  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher nachgewiesen. Der Resorptionsweg des  $\text{Cl}^-$  in diesem Segment ist unklar. Möglicherweise folgt der Hauptanteil der Chlorionen dem aktiv resorbierten Natrium parazellulär (Sandle und McGlone, 1987).

Für die auch unter physiologischen Bedingungen wichtige  $\text{Cl}^-$ -Sekretion wird Chlorid über den elektroneutralen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -2  $\text{Cl}^-$ -Cotransporter von basolateral in die Zelle aufgenommen. Die primär treibende Kraft für diesen Vorgang liefert die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe, die die intrazelluläre Natriumkonzentration niedrig hält. Diesem Gradienten folgt das extrazelluläre  $\text{Na}^+$  und bringt die Chlor- (und Kalium-)Ionen mit in die Zelle hinein. Vervollständigt wird die Sekretion über apicalen Austritt durch  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (Binder und Sandle, 1994).

Der apicale  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher betreibt distal neben der Chlorid-Resorption die aktive Bicarbonat-Sekretion. Das sezernierte  $\text{HCO}_3^-$  liefert zum großen Teil der innerzellulären Stoffwechsel (s.o.; Frizzell et al., 1976). Daneben verläßt Bicarbonat die Zelle distal und proximal auch über apicale  $\text{HCO}_3^-$ -Kanäle (Schultheiß et al., 1998). Einen weiteren Beitrag zur Entfernung von Bicarbonat aus der Zelle dürfte der für die basolaterale Membran postulierte  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher leisten (Binder und Sandle, 1994; Schultheiß et al., 1998; Abb. I.3).



**Abb. I.3:** Modell zum Ionentransport am Colon der Ratte. Der apicale Cl<sup>-</sup> - HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -Austauscher existiert nur distal. Die H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase weist proximal nur ca. 20% der Aktivität im distalen Segment auf (s. Text).

### 1.2.3 Steuerung des Ionentransports

Wie die Motilität (Peristaltik und Sphinkterfunktion) und die Durchblutung des Magen-Darm-Trakts wird auch der Elektrolyttransport in der Mucosa sowohl neural als auch humoral gesteuert (Wood, 1994).

Die nervale Regulation wird durch das enterale Nervensystem geleistet, das autonom arbeitet (Vaupel und Ewe, 1995). Der Informationsübermittlung zwischen enteralem Nervensystem und Epithel dient eine Vielzahl von Transmittoren; dazu zählen Acetylcholin, Noradrenalin, Serotonin, VIP, Substanz P, Neuropeptid Y, Somatostatin u. a. (Bridges et al., 1986; Binder und Sandle, 1994). Das zentrale und das vegetative Nervensystem dienen lediglich der Modulation der Aktivitäten des enteralen Nervensystems.

Das enterale Nervensystem stellt ein neuronales Netzwerk im Magen-Darm-Trakt dar, das aus mehreren, mikroskopisch voneinander abgrenzbaren Elementen zusammengesetzt ist (Vaupel und Ewe, 1995). Der Plexus myentericus zwischen longitudinaler und circulärer Schicht der Tunica muscularis kontrolliert schwerpunktmäßig die glatte Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, also den Tonus und die Kontraktionsrhythmik, die für die Peristaltik sorgt.

Der Plexus submucosus, der im lockeren Bindegewebe der Tela submucosa eingebettet ist, steht in enger Verbindung zu den Epithelzellen und beeinflusst deren resorptive und sekretorische Funktionen (Vaupel und Ewe, 1995). Spontan aktive, inhibitorische Neurone des Plexus submucosus senken den auf maximale Resorption eingestellten Set-point der Mucosa ab (Andres et al., 1985). Daneben steuert er die Schleimhaut-Durchblutung über eine vasodilatatorische Innervation der Submucosa-Gefäße (Surprenant, 1992).

Das dritte Element des enteralen Nervensystems ist der schon vor 140 Jahren erstmals beschriebene Plexus mucosus (Billroth, 1858), der von Bridges et al. 1986 näher untersucht wurde. Feine Nervenfasern umgeben jede einzelne Schleimhaut-Krypte und stehen mit einem Netz stärkerer Fasern in Verbindung, die unmittelbar über der Lamina muscularis mucosae liegen. Nachgewiesen ist sein Einfluß auf den Elektrolyttransport in den Enterozyten (Bridges et al., 1986). Zusammenhänge mit der Regulation der Motilität und der Durchblutung der Mucosa sind noch Spekulation.

Wichtige Faktoren der humoralen Steuerung des epithelialen Elektrolyttransports sind Hormone des Verdauungstrakts, z. B. Sekretin, Gastrin und Cholezystokinin, und Entzündungsmediatoren, wie Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine oder Histamin (Vaupel und Ewe, 1995).

Prostaglandine arbeiten bei der Modulation des Ionentransports in enger Verbindung mit dem darmeigenen Nervensystem. Sie stimulieren über Neurone des Plexus submucosus die Chlorid-Sekretion der Mucosa. Daneben können Prostaglandine die sekretorische Funktion auch durch eine direkte Aktivierung der Enterozyten steigern (Diener et al., 1988). Zugleich wird der Mucosa-nach-Serosa-Transport von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Na}^+$  gehemmt (Binder und Sandle, 1994; Beubler und Juan, 1978). Neben der Transportfunktion beeinflussen Prostaglandine auch die Durchblutung der Schleimhaut, indem sie eine Dilatation von Arteriolen induzieren (Surprenant, 1992).

Der Hauptanteil der mucosal wirksamen Prostaglandine wird von subepithelialen Zellen gebildet (Craven und DeRubertis, 1984), insbesondere von den in die Lamina propria eingelagerten Mastzellen und Phagozyten (Binder und Sandle, 1994). Als auslösender Reiz für die Prostaglandin-Ausschüttung wirkt z. B. die mechanische Stimulation des Gewebes (Beubler und Juan, 1978); unter experimentellen Bedingungen ist das die Manipulation des Darms bei der Präparation für den Versuch.

### 1.3 Fragestellung

Allgemein findet im Dickdarm unter physiologischen Verhältnissen eine Wasser- und NaCl-Resorption statt. Viele Durchfallerkrankungen gehen mit einer Umkehr resorptiver bzw. Steigerung sekretorischer Ionentransportprozesse einher. Die Sekretion der Elektrolyte wird von einem H<sub>2</sub>O-Verlust begleitet, da das Wasser passiv den Ionen, z. B. vermehrt sezerniertem K<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup>, folgt (Foster et al., 1983; Fromm und Hierholzer, 1995). Um diese sekretorischen Diarrhoen causal behandeln zu können, ist die genaue Kenntnis der Regulation der verschiedenen Ionentransportsysteme Voraussetzung.

In diesen Zusammenhang fällt auch die Frage, ob bzw. inwieweit der Anstieg des Adrenalin-Blutspiegels am Zustandekommen der Streß-induzierten Diarrhoe beteiligt ist.

Das Catecholamin Noradrenalin ist als Transmitter des enteralen Nervensystems direkt an der Steuerung des Elektrolyttransports beteiligt. Da Adrenalin und Noradrenalin sehr ähnliche Wirkungen im Organismus haben, Noradrenalin aber eine geringe Affinität zu  $\beta_2$ -Rezeptoren besitzt, während Adrenalin eine gleichmäßige, unspezifische  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Aktivierung herbeiführt, fiel die Wahl auf Adrenalin als Versuchssubstanz, um auch eventuelle  $\beta_2$ -Effekte an der Darmschleimhaut erfassen zu können.

Deswegen wurde jetzt der Einfluß von Adrenalin auf den Transport von K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Bicarbonat im Colon der Ratte genauer untersucht. Konkret sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Induziert Adrenalin eine K<sup>+</sup>-Sekretion am Colon der Ratte ?
- Gibt es Segmentunterschiede in der Wirkung ?
- Wie wird der Effekt vermittelt ?
- Welche Rezeptoren werden dabei stimuliert ?

## II. Material und Methoden

### 2.1 Elektrolytlösungen

Die nicht gesondert aufgeführten Versuche wurden in Standard-Parsons-Lösung (Parsons und Paterson, 1965) durchgeführt. Deren Zusammensetzung lautete ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): NaCl 107, KCl 4,5,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,8,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2,  $\text{CaCl}_2$  1,25,  $\text{MgSO}_4$  1, Glucose 12. Der pH-Wert wurde mit HCl/ $\text{NaHCO}_3$  auf 7,4 eingestellt und die Lösung während der gesamten Dauer der Verwendung mit Carbogen (5 %  $\text{CO}_2$  / 95 %  $\text{O}_2$ ) begast.

Für die  $\text{Rb}^+$ -Fluß-Messungen wurde KCl durch die gleiche Konzentration an RbCl ersetzt.

In Cl<sup>-</sup>-freien Lösungen wurde NaCl durch die gleiche Konzentration an Natriumgluconat ersetzt. In diesem Fall wurde die Calcium-Konzentration auf  $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  angehoben, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -puffernden Eigenschaften des Gluconats auszugleichen (Kenyon und Gibbons, 1977).

Für die Versuche zur Messung der Bicarbonat-Sekretion wurde eine pufferfreie Parsons-Lösung verwendet ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): NaCl 135,8, KCl 4,5, Glucose 12,2,  $\text{CaCl}_2$  1,25,  $\text{MgSO}_4$  1,0. Diese Lösung wurde aus zur Entfernung von  $\text{CO}_2$  abgekochtem (30 min) Aqua dest. hergestellt, das durch permanente  $\text{O}_2$ -Begasung mit Sauerstoff gesättigt war. Der pH-Wert wurde mit HCl/NaOH auf 7,4 eingestellt.

### 2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten zwischen 180 g und 220 g aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und von Harlan-Winkelmann, Borschen, verwendet. Die Tiere wurden unter einem 12 h-hell-12 h-dunkel-Regime gehalten und hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser.

## **2.3 Gewebepräparation**

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Ratten durch einen Schlag auf den Kopf und anschließendes Ausbluten getötet (Genehmigung der Tötung der Tiere zur Organentnahme durch das Regierungspräsidium Gießen). Anschließend wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba eröffnet. Das Colon descendens wurde aufgesucht und unmittelbar distal des Lymphknotens am Übergang Colon-Rectum (Lindström et al., 1979) abgesetzt. Das Colon wurde stumpf vom Mesenterium abpräpariert und proximal am Übergang zum Caecum abgetrennt.

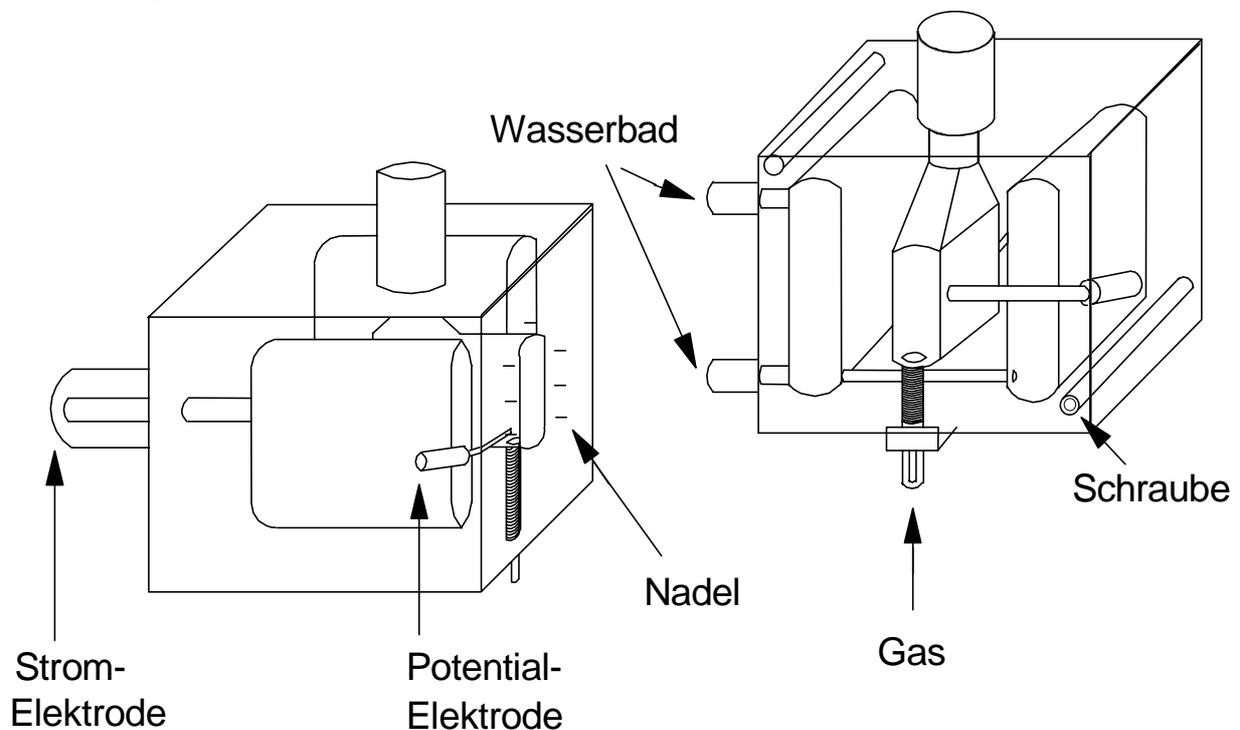
Danach wurde das Lumen mit eisgekühlter Parsons-Lösung von Darminhalt freigespült und der Darm auf einen PVC-Stab, Durchmesser 5 mm, aufgezogen. Nach einer zirkulären Inzision mit einem stumpfen Skalpell ca. 5 mm vom distalen Darmende entfernt wurden Tunica serosa und muscularis in proximaler Richtung vorsichtig abgestreift. Das verbleibende Mucosa-Submucosa-Präparat wurde in vier ca. 3 cm lange Segmente unterteilt, jedes Stück längs eröffnet und anschließend in der Ussing-Kammer eingespannt.

Zur Unterscheidung des distalen vom proximalen Colonabschnitt dient die markante, palmbblätterartige Schrägstreifung der Schleimhaut, die ausschließlich am proximalen Colon zu finden ist (Lindström et al., 1979).

## **2.4 Ussing-Kammer**

Alle Versuche wurden mit Hilfe modifizierter Ussing-Kammern (Abb. II.1) ausgeführt. Eine Ussing-Kammer besteht aus zwei Plexiglasquadern. Das Gewebepräparat (s. o.) wird auf einer der Kammerhälften zwischen 7 Nadelspitzen aufgespannt. Beide Hälften werden durch Schrauben miteinander verbunden, nachdem zuvor die Kontaktflächen zum Abdichten mit Silikon (Baysilone<sup>®</sup>-Paste mittelviskös, Bayer AG, Leverkusen) bestrichen wurden. Zwischen beiden Kammerhälften verbleibt eine freie Gewebefläche von 1 cm<sup>2</sup>

mit beidseitigem Kontakt zur Nährlösung. Durch die Öffnungen an der Oberseite der Kammer werden die Lösungen eingefüllt bzw. abgesaugt und durch frische Lösung ersetzt sowie Wirkstoffe zugegeben. An der Unterseite besitzt die Kammer zwei Fritten für die kontinuierliche Begasung der Elektrolytlösungen. Zweck der Begasung ist die Konstanthaltung des pH-Werts der Lösung sowie die Sauerstoffversorgung des Gewebes. Zudem besteht in der Kammer, ohne Verbindung zum Lösungsreservoir, ein Durchflußsystem mit Anschluß an einen Warmwasserkreislauf, womit die Nährlösung auf konstant 38°C gehalten wird. Das Lösungsvolumen beträgt auf beiden Seiten des Gewebes je 3,5 ml.



**Abb. II.1:** Schema einer modifizierten Ussing-Kammer.

Unter diesen Bedingungen bleibt das Colongewebe über 5 Stunden lebens- und funktionsfähig. Elektronenmikroskopisch sind nach dieser Versuchsdauer keine morphologischen Veränderungen festzustellen (Diener et al., 1989).

Die durch das Darmgewebe transportierten Elektrolytmengen sind zu gering, um die resultierenden Konzentrationsänderungen in den Nährlösungen auf beiden Seiten des Gewebes durch chemische Analysen bestimmen zu können. Die Ussingkammer-Technik ist eine Methode zur Erfassung des Transports von Ladung - in Form von Ionen - durch die biologische Membran. Diese elektrischen Messungen sind empfindlich genug, um die vom Gewebe erbrachten Ladungsverschiebungen mit ausreichender Genauigkeit zu messen.

## **2.5 Elektrische Messungen**

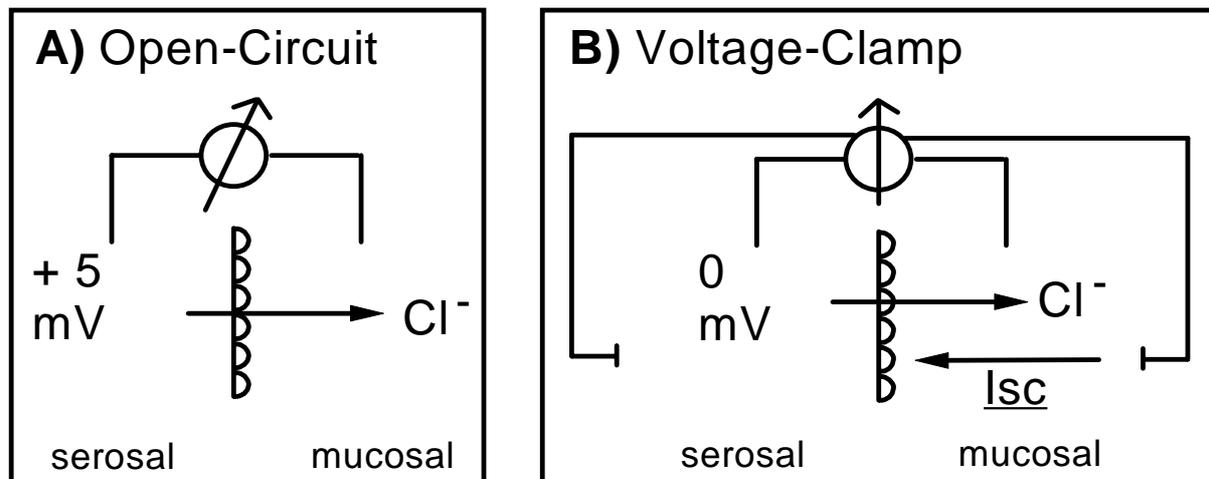
Zur Durchführung der elektrischen Messungen wurden die Ussing-Kammern an eine computerkontrollierte Voltage-Clamp-Anlage (Ing. Büro für Meß- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen) angeschlossen. Die Kammern besaßen Silber-Silberchlorid-Elektroden zur kontinuierlichen Messung der Potentialdifferenz (Pd) zwischen beiden Kammerhälften, die über leitfähige Agarbrücken und KCl-Lösung ( $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) mit den Elektrolytlösungen in der Kammer in Kontakt standen.

Vor den eigentlichen Versuchsbeginn war eine Meßperiode vorge-schaltet, in der die Kammern die im jeweiligen Versuch eingesetzte Elektrolyt-lösung enthielten, aber noch kein Gewebe. In dieser Phase wurden der Widerstand der Lösung und die Potentialdifferenz zwischen den beiden Pd-Elektroden selbst ermittelt.

Die Agarbrücken, die die Elektrolytlösungen auf beiden Gewebeseiten mit den Meßelektroden verbinden, dienen dem Schutz des Gewebes vor Kon-takt mit der hochkonzentrierten KCl-Lösung, in die die Elektroden eintauchen und die das Gewebe zerstören würde. Die Kontaktflächen zwischen den Agar-brücken und der Nährlösung sind so klein, daß der Ionenaustausch zwischen Agar und Lösung vernachlässigbar gering ist.

Das zwischen den Kammerhälften eingespannte Rattencolon sezerniert spontan Anionen ( $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ ; Strabel et al., 1995), wodurch sich zwischen der mucosalen und der serosalen Gewebeseite eine Spannung aufbaut. Die beiden Agarbrücken mit Verbindung zu den Pd-Elektroden enden dabei in größtmöglicher Nähe zum Gewebe (Abstand 1 mm). So wird die durch das Gewebe erzeugte Potentialdifferenz möglichst wenig vom Lösungswiderstand zwischen den Brücken und dem Gewebe abgeschwächt. Außerdem erfolgt durch den Computer eine automatische Korrektur der gemessenen Pd um den in der Vorlaufphase ermittelten Potentialunterschied zwischen den Elektroden selbst (Messung im sog. „Open-Circuit“-Modus, Abb. II.2.A).

## Messung des Kurzschlußstroms ( $I_{sc}$ ) in der Ussing-Kammer:



**Abb. II.2:** Das Gewebe baut spontan eine Potentialdifferenz zwischen mucosaler und serosaler Seite auf, die als treibende Kraft für Ionenbewegungen wirkt. Sie wird durch die Applikation des Kurzschlußstroms ( $I_{sc}$ ) aufgehoben.

Um den elektrischen Gradienten als treibende Kraft für eine Ionenbewegung durch das Gewebe auszuschließen, wurde die spontane Potentialdifferenz durch Applizieren eines sog. Kurzschlußstroms ( $I_{sc}$ ) über die Stromelektroden kompensiert, d.h. auf Null „geklemmt“.

Die Applikation des Isc erfolgte über ein zweites Paar Ag/AgCl-Elektroden, das ebenfalls durch Agarbrücken von den Kammern getrennt war.

Die Agarbrücken der Stromelektroden enden möglichst weit entfernt vom Gewebe und besitzen einen relativ großen Durchmesser. Dadurch ist die Entfernung zwischen Agar und Gewebe in der Mitte der Meßfläche nur unwesentlich kleiner als am Rand. Dies gewährleistet eine gleichmäßige Isc-Applikation über die gesamte Gewebefläche (Messung im sog. „Voltage-Clamp“-Modus, Abb. II.2.B).

Durch die Verwendung identischer Ionenkonzentrationen in der mucosalen und serosalen Elektrolytlösung sowie gleicher Lösungsvolumina auf beiden Seiten des Gewebes wurden auch chemische und hydrostatische Gradienten ausgeschlossen. Die gemessenen Isc-Änderungen können somit nur durch aktiven Transport von Ionen durch das Gewebe zustande kommen. Ein positiver Isc zeigt einen aktiven Netto-Kationentransport durch das Gewebe von mucosal nach serosal bzw. einen Netto-Anionentransport in umgekehrter Richtung an.

Zur Ermittlung der Gewebeleitfähigkeit (Gt) wurde alle 60 s ein bipolarer Stompuls von 50  $\mu\text{A}$  über eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe appliziert. Aus der resultierenden Potentialänderung wurde anschließend nach dem Ohm'schen Gesetz die Gt berechnet ( $R = U/I$ ; Gt ist der Kehrwert des Widerstands R). Der Lösungswiderstand zwischen den Agarbrücken wurde automatisch kompensiert. Isc, Pd und Gt wurden kontinuierlich aufgezeichnet und jede Minute ausgedruckt. Der Isc wurde als Ladungstransfer pro Zeit und Gewebefläche ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) angegeben, um einen direkten Vergleich mit den Ionenflüssen zu ermöglichen ( $26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} = 1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ).

Unter Standard-Versuchsbedingungen (identische Elektrolytlösungen in beiden Kammerhälften) werden mit der Ussing-Technik nur die aus den aktiven Ionentransporten resultierenden Netto-Ströme gemessen. Um differenzieren zu können, inwieweit Kationen- bzw. Anionenbewegungen dazu beitragen, in

welcher Richtung die einzelnen Transporte erfolgen und welche Ionen im einzelnen beteiligt sind, werden zusätzlich Versuche durchgeführt, bei denen ein Teil der Ionen durch die entsprechenden Radioisotope ersetzt ist.

## **2.6 Messungen unidirektionaler Ionenflüsse**

### *2.6.1 K<sup>+</sup>-Flüsse*

Zur Messung der resorptiven ( $J_{ms}$ ) und sekretorischen ( $J_{sm}$ ) K<sup>+</sup>-Ionenflüsse wurde im Versuch K<sup>+</sup> durch Rb<sup>+</sup> ersetzt. Rb<sup>+</sup> wird über die gleichen Mechanismen wie K<sup>+</sup> in der Darmwand transportiert (Foster et al., 1984); das verfügbare Radioisotop <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> besitzt aber eine erheblich längere Halbwertszeit (17d) als das <sup>42</sup>K<sup>+</sup>-Isotop.

Nach einer 60-minütigen Phase, in der sich der Isc auf ein gleichmäßiges Niveau stabilisierte, wurde <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (37 kBq) auf einer Seite des Gewebes zugegeben, zur Messung der Rb<sup>+</sup>-Resorption auf der mucosalen Seite, zur Messung der Sekretion auf der serosalen Seite. Nach weiteren 20 Minuten, in denen der Isotopenfluß ein stabiles Niveau erreichte, wurde der basale unidirektionale Rb<sup>+</sup>-Fluß bestimmt. Dazu wurden zu Beginn und am Ende einer 20-Minuten-Periode aus der nicht radioaktiv markierten Kammerhälfte Doppelproben von je 250 µl entnommen und durch frische RbCl-Parsons-Lösung (unmarkiert) ersetzt. Aus der Zunahme an radioaktiver Strahlung über diesen Zeitraum wurde die Rb<sup>+</sup>-Transportrate errechnet. Durch Wiegen der Probengefäße vor und nach Einfüllen der entnommenen Proben wurde das exakte Probenvolumen ermittelt.

Fünf Minuten nach Ende dieser Basalfluß-Periode wurde Adrenalin ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) serosal zugegeben. Weitere 5 Minuten danach startete die zweite Flußperiode von 20 Minuten, in der die Veränderungen des Rb<sup>+</sup>-Transports nach Adrenalin bestimmt wurde. Aus den gemessenen unidirektionalen Flüssen wurden Netto-Ionenflüsse berechnet:  $J_{\text{Rb}}^{\text{net}} = J_{\text{Rb}}^{\text{ms}} - J_{\text{Rb}}^{\text{sm}}$ .

Die Radioaktivität in den Proben wurde nach Zusetzen von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (rotiszint<sup>®</sup> eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einem  $\beta$ -Szintillationscounter (TRI-CARB<sup>®</sup> 2000CA Liquid Scintillation Analyzer, Packard, Frankfurt) gemessen. Die Hintergrundaktivität wurde anhand von Leerwerten mitbestimmt und von den übrigen Meßwerten subtrahiert.

### 2.6.2 $\text{Na}^+$ - und $\text{Cl}^-$ -Flüsse

Nach dem gleichen Prinzip wie die  $\text{Rb}^+$ -Flüsse wurden die unidirektionalen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Flüsse bestimmt. In diesem Fall wurde mucosal bzw. serosal ein  $^{22}\text{Na}/^{36}\text{Cl}$ -Gemisch zugegeben (59 kBq  $^{22}\text{Na}/29$  kBq  $^{36}\text{Cl}$ ). 60 min nach Versuchsbeginn wurden die Isotope mucosal oder serosal zugesetzt. Nach weiteren 20 min zur Stabilisation der Ionenflußraten wurde der Basalionenfluß sowie 5 min nach Adrenalinzugabe dessen Änderung über Perioden von je 20 min bestimmt.

Die Messung der Aktivität erfolgte für  $^{22}\text{Na}$  in einem  $\gamma$ -Szintillationscounter (Auto-Gamma<sup>®</sup> 5000 Series MINAXI, Packard, Frankfurt), für  $^{36}\text{Cl}$  in einem  $\beta$ -Counter (TRI-CARB<sup>®</sup> 2700 TR Liquid Scintillation Analyzer, Packard, Frankfurt).  $^{22}\text{Na}$  strahlt in das  $^{36}\text{Cl}$ -Zählfenster ein. Daher wurden Proben mitgemessen, die ausschließlich  $^{22}\text{Na}$  enthielten, und anschließend die Kontamination durch die  $^{22}\text{Na}$ -Strahlung von den  $^{36}\text{Cl}$ -Meßwerten abgezogen.

Der Residualionenfluß  $JR_{\text{net}}$ , d. h. alle Ionenbewegungen außer  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Flüssen, wurde wie folgt berechnet:  $JR_{\text{net}} = I_{\text{sc}} - (J_{\text{Na}_{\text{net}}} - J_{\text{Cl}_{\text{net}}})$ . Ein positiver Residualionenfluß bedeutet entweder eine Kationen-Resorption oder eine Anionen-Sekretion.

### 2.6.3 Sekretorischer $\text{HCO}_3^-$ -Fluß

Zur Messung der Bicarbonat-Sekretion wurde eine Titrationstechnik verwendet, bei der die Alkalinisierung einer ungepufferten Elektrolytlösung bestimmt wurde. Diese pH-Wert-Anhebung kam infolge des  $\text{HCO}_3^-$ -Transports von einer Gewebeseite auf die andere zustande (Winterhager et al., 1986). Dazu wurde die Nährlösung auf der mucosalen Gewebeseite durch pufferfreie Parsons-Lösung ersetzt. Serosal wurde Parsons-Standard-Lösung verwendet.

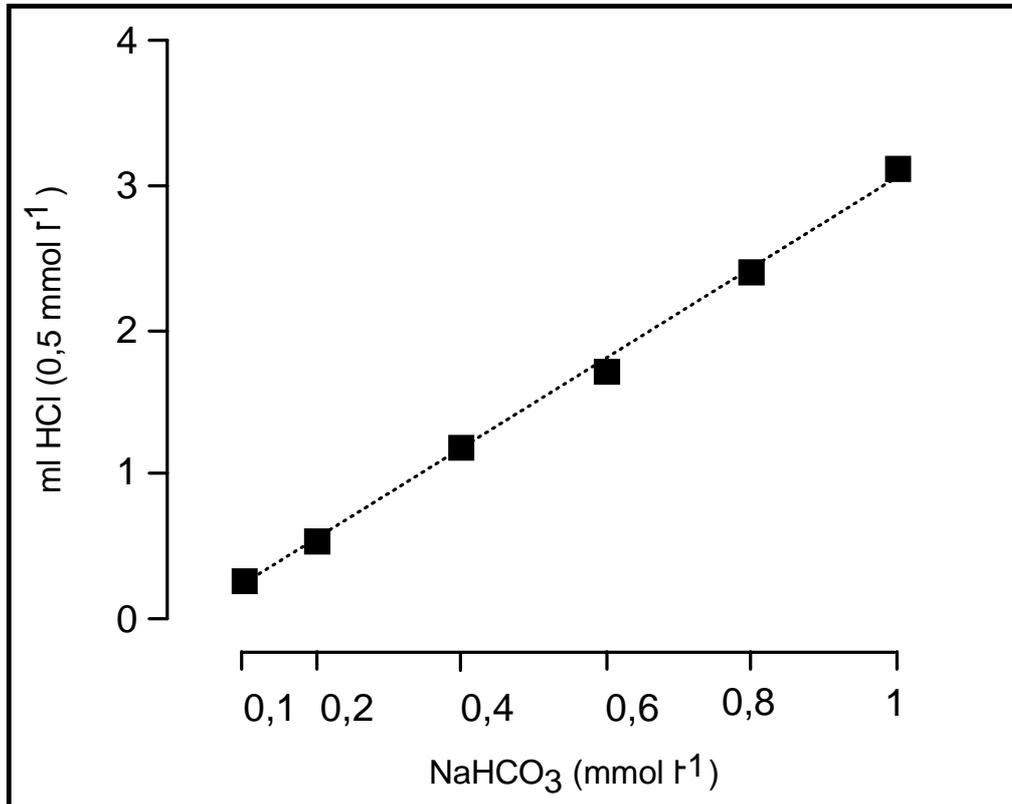
Nach einer Stabilisationsphase von 60 min wurde der Puffer auf beiden Seiten des Gewebes durch frische Lösungen ersetzt (mucosal: pufferfreie Parsons-Lösung mit  $\text{O}_2$ -Begasung, serosal: Parsons-Standard-Puffer mit Carbogen-Begasung). Während 2 Perioden von jeweils 30 min wurde der basale sekretorische Bicarbonat-Transport bestimmt. Zu Beginn der 3. Periode wurde in den Testgeweben jeweils Adrenalin ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) serosal zugegeben und die Änderung der Bicarbonat-Transportrate während der 3. und 4. Flux-Periode (ebenfalls je 30 min) ermittelt. Ein Vergleich erfolgte mit einer Kontrollgruppe, die kein Adrenalin erhielt. Zur Probennahme wurde das Kammervolumen mucosal und serosal vollständig abgesaugt und mit je 3,5 ml frischen Lösungen wieder aufgefüllt, die, falls notwendig, auch Adrenalin enthielten.

Alle Versuche wurden mit Bumetanid-Vorbehandlung ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  serosal) durchgeführt, um die spontane und Adrenalin-stimulierte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion zu unterdrücken.

Die Bestimmung der Bicarbonat-Konzentration erfolgte titrimetrisch und anhand des Vergleichs mit einer Eichkurve: Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine Bicarbonat-Verdünnungsreihe ( $0,1 - 1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , unter Verwendung von sauerstoffgesättigtem A. dest., s. o.) hergestellt. Proben jeder Verdünnungsstufe mit einem Volumen von 2,5 ml wurden unter  $\text{O}_2$ -Begasung mit  $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  HCl-Lösung auf pH 7,0 titriert. Die aus den verbrauchten

Volumina an HCl sich ergebende Eichkurve (s. Abb. II.3) hatte einen linearen Verlauf (Korrelationskoeffizient  $r = 0,996$ ).

### Bicarbonat-Eichkurve:



**Abb. II.3:** Die SEM-Werte werden von den Symbolen der Mittelwerte (Quadrate) verdeckt. Die gestrichelte Linie stellt die Bestgerade dar (Eichkurve:  $r = 0,996$ ).  $n = 6$ .

Zur Ermittlung der Bicarbonat-Transportrate durch das Gewebe wurden 2,5 ml der mucosal gewonnenen Proben unter O<sub>2</sub>-Begasung mit 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> HCl auf pH 7,0 titriert. Die dem verbrauchten HCl-Volumen entsprechende Bicarbonat-Konzentration in der Probe wurde an der Eichkurve abgelesen und daraus die Konzentration in der mucosalen Kammerhälfte und die Transportrate pro Zeit und Stunde errechnet.

## 2.7 Chemikalien:

Adrenalin, Atenolol (Geschenk von Zeneca, Plankstadt), Atropin-Sulfat, Hexamethonium-Chlorid, ICI 118551 (1-[2,3-(Dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol-Hydrochlorid, Tocris, Bristol, Großbritannien), Prazosin-Hydrochlorid (Geschenk von Pfizer, Karlsruhe), Propranolol (Aldrich, Steinheim) und Tetraethylammonium-Chlorid (TEA) wurden in einer wässrigen Stammlösung angesetzt.

Tetrodotoxin (TTX) wurde in  $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Citratpuffer gelöst.

Bumetanid, Indometacin, Quinin-Hydrochlorid und Yohimbin wurden in Ethanol gelöst (maximale Ethanol-Endkonzentration in der Kammer 0,25 Vol%).

Phentolamin-Methansulfat (Aldrich, Steinheim) wurde in DMSO gelöst (maximale Endkonzentration in der Kammer 0,28 Vol%).

Falls nicht anders angegeben, waren alle Chemikalien von Sigma, Deisenhofen.

Die Radioisotope stammten von NEN Life Science Products, Köln. Die spezifischen Aktivitäten betragen für  $^{22}\text{Na}$ : 3,9 TBq/g, für  $^{36}\text{Cl}$ : 550 MBq/g; die anfängliche Aktivität von  $^{86}\text{Rb}$  betrug 411 GBq/g.

## 2.8 Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Statistische Vergleiche wurden mit verbundenem oder unverbundenem Student's t-Test durchgeführt oder, falls der F-Test signifikante Abweichungen zwischen den Varianzen der zu vergleichenden Mittelwerte ergab, mit dem U-Test. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Regressionsgeraden wurden anhand des linearen Korrelationskoeffizienten  $r$  getestet. Die Größe der Variabilität, d. h. des Auftretens oder Nicht-Auftretens der 1. bzw. 2. Phase der Adrenalin-Antwort, wurde mittels  $\chi^2$ -Test (Vierfelder-Test) ermittelt. Die Standardabweichung errechneter Werte (Netto-Ionenflüsse) wurde nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den Abweichungen von  $J_{ms}$  und  $J_{sm}$  errechnet.

### III. Resultate

#### 3.1 Die Wirkung von Adrenalin auf die elektrischen Parameter

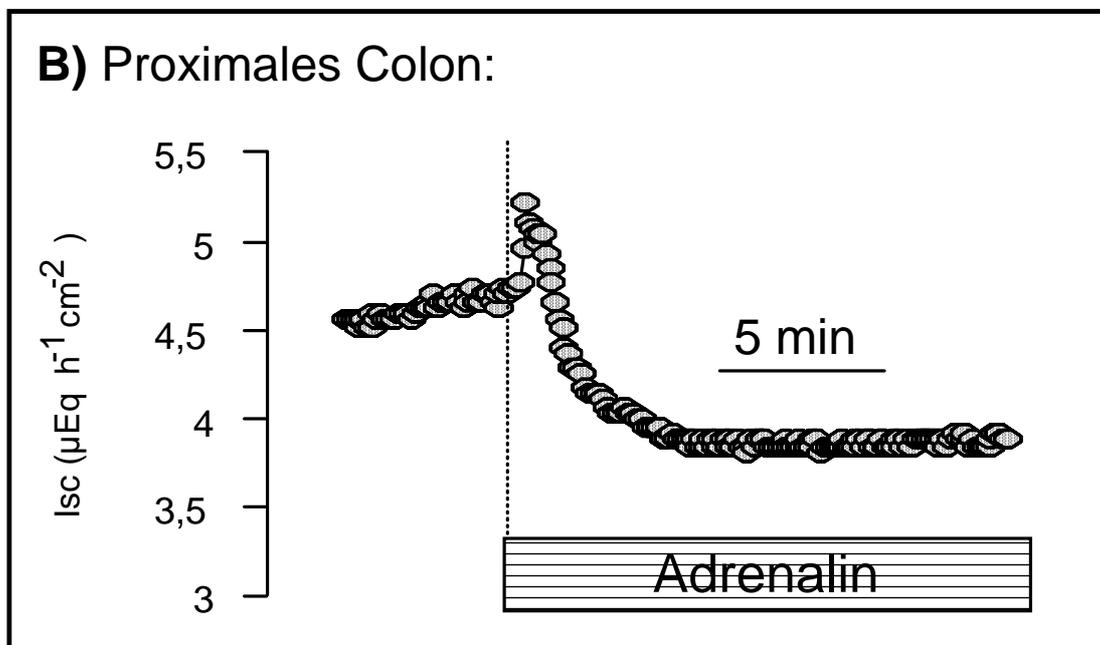
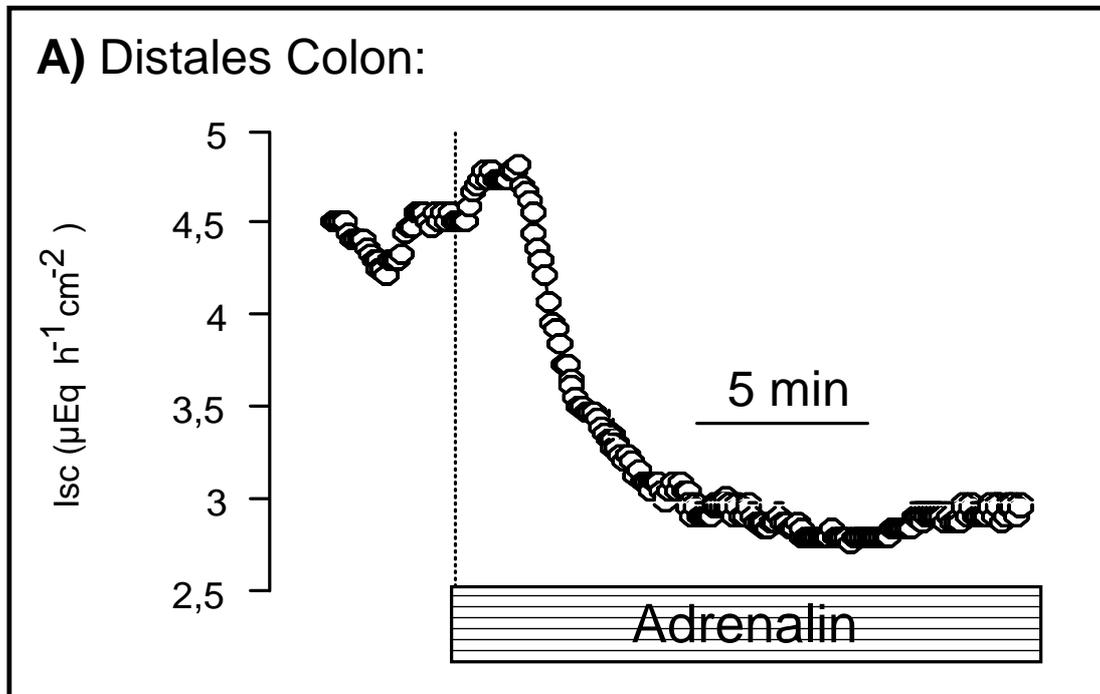
##### 3.1.1 Segmentabhängigkeit

Der basale Kurzschlußstrom (Isc) im Colon der Ratte sank von einem zu Versuchsbeginn höheren Niveau während einer einstündigen Stabilisierungsphase auf  $3,4 \pm 0,1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  im distalen ( $n = 86$ ) wie im proximalen Colon ( $n = 85$ ). Die Gewebeleitfähigkeit (Gt) war distal mit  $15,7 \pm 0,8 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n = 86$ ) um etwa die Hälfte geringer als proximal ( $32,4 \pm 2,3 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $n = 85$ ,  $p < 0,05$  versus distales Colon).

Nach Zugabe von Adrenalin ( $5\cdot 10^{-6} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) in die serosale Kammerhälfte war in beiden Segmenten eine biphasische Isc-Antwort zu beobachten: In der 1. Phase stieg der Isc kurzfristig um  $0,2 \pm 0,0 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  distal ( $n = 86$ ,  $p < 0,05$ ) bzw.  $0,3 \pm 0,0 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  proximal ( $n = 85$ ,  $p < 0,05$ ) an und fiel in der 2. Phase um  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  distal ( $n = 86$ ,  $p < 0,05$ ) bzw.  $0,7 \pm 0,1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  proximal ( $n = 85$ ,  $p < 0,05$ ) unter den Basalwert ab (Abb. III.1). In der 2. Phase war zudem ein Gt-Anstieg zu beobachten, der proximal mit einer Zunahme um  $0,8 \pm 0,6 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$  erheblich deutlicher ausfiel als distal ( $0,1 \pm 0,1 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $p < 0,05$  versus proximales Colon; Tab. 1).

Die Wirkung von Adrenalin auf den Kurzschlußstrom (Isc): 1. Phase: ein kurzer Isc-Anstieg

2. Phase: ein langanhaltender Isc-Abfall



**Abb. III.1:** Die Kurven zeigen typische Isc-Antworten der Gewebe auf die Zugabe von Adrenalin ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  serosal).

### 3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Isc-Änderung

Als Parameter für den zeitlichen Verlauf der beiden Phasen der Adrenalin-Antwort wurde die Zeitdauer bis zum Erreichen der halbmaximalen Isc-Änderung verwendet. Diese Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) betrug für die 1. Phase, gemessen ab Zugabe von Adrenalin,  $21 \pm 5$  s distal ( $n = 7$ ) bzw.  $31 \pm 7$  s proximal ( $n = 6$ ). Nach  $46 \pm 9$  s (distales Colon,  $n = 7$ ) bzw.  $105 \pm 33$  s (proximales Colon,  $n = 5$ ) war der Strom wieder auf das Niveau der Grundlinie vor Adrenalingabe abgesunken.

Als Anfang der 2. Phase wurde der Zeitpunkt angesehen, zu dem nach Abklingen der 1. Phase der Isc den Basalwert wieder erreicht hatte. Die zweite Phase entwickelte sich mit einer  $t_{1/2}$  von  $104 \pm 14$  s distal ( $n = 7$ ) bzw.  $173 \pm 49$  s proximal ( $n = 7$ ) und war über mehr als 900 s stabil (Tab. 1).

Tabelle 1: Adrenalin-Effekt auf elektrische Parameter und Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Isc-Antwort:

	Distales Colon		Proximales Colon		n
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	
$\Delta$ Isc ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$0,2 \pm 0,0^*$	$-0,9 \pm 0,1^*$	$0,3 \pm 0,0^*$	$-0,7 \pm 0,1^*$	85-86
$\Delta$ Gt ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$0,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1^*$	$0,8 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,4^{*\#}$	85-86
$t_{1/2}$ (s)	$21 \pm 5$	$31 \pm 7$	$104 \pm 14$	$173 \pm 49$	5-7
Dauer (s)	$46 \pm 9$	> 900	$105 \pm 33$	> 900	5-7

Isc und Gt sind angegeben als Änderung der Parameter ( $\Delta$ ) im Vergleich zur Baseline unmittelbar vor Zugabe von Adrenalin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal). Die Dauer der beiden Phasen wurde definiert als Intervall zwischen der Zugabe von Adrenalin und dem Zeitpunkt, zu dem das Niveau der Baseline vor Zugabe der Substanz wieder erreicht wurde. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  versus Baseline, #  $p < 0,05$  versus distales Colon.

Die Verteilung der Ausprägung der Isc-Änderung nach Adrenalin:

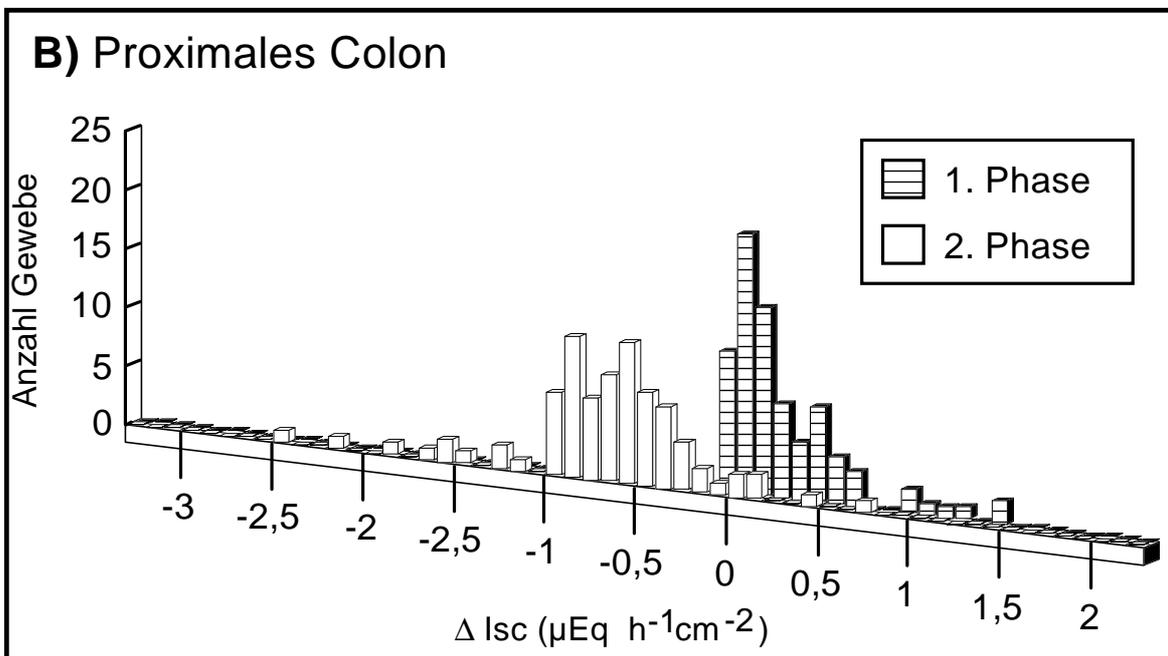
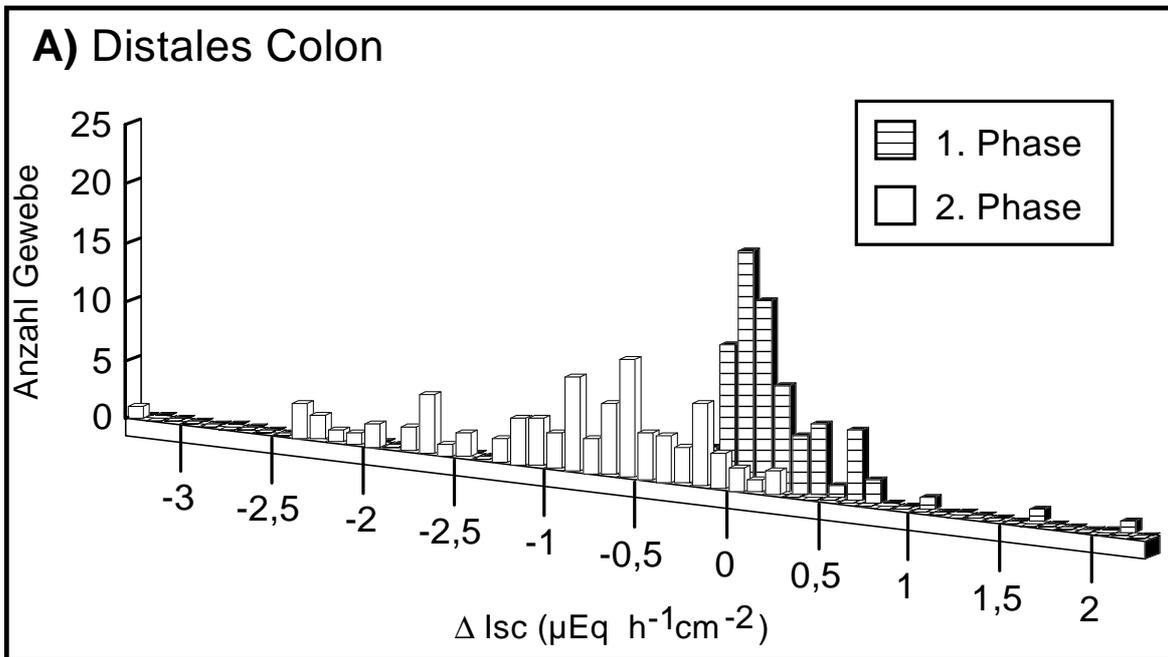


Abb. III.2: n = 85 - 86.

### *3.1.3 Variabilität*

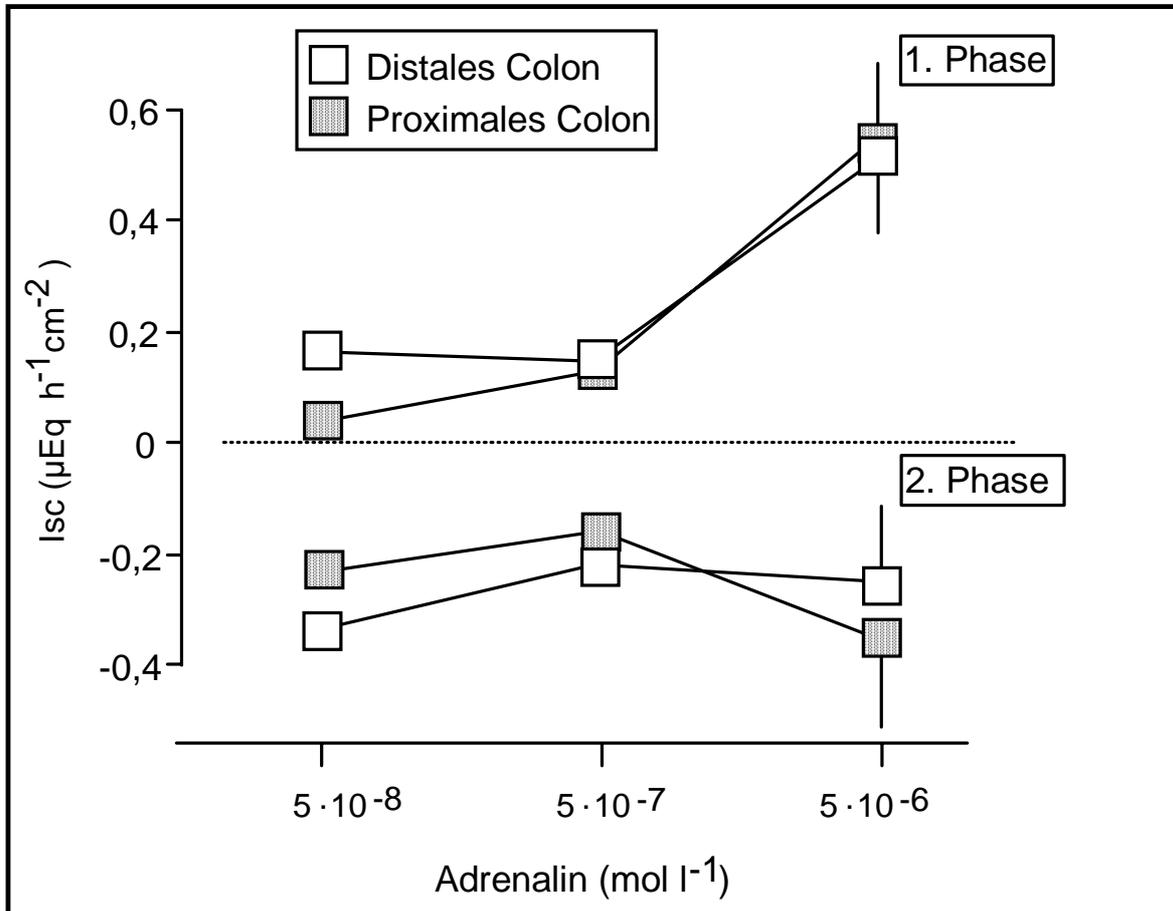
Nicht alle Gewebe zeigten solch eine Isc-Antwort. Wenn ein Adrenalin-Effekt als Änderung des Isc um mindestens  $0,1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  definiert wurde, erfolgte der Stromanstieg distal lediglich bei 60 von 86, proximal bei 67 von 85 Geweben, d.h. in 70% (distal) bzw. 79% (proximal) der Versuche. Die Isc-Senkung dagegen war in 93% der Fälle (80 von 86 Geweben) distal bzw. 92% der Fälle (78 von 85 Geweben) proximal zu beobachten. Daraus ergab sich in beiden Segmenten bei einem Vergleich mittels  $\chi^2$ -Test für die 1. Phase der Isc-Antwort auf Adrenalin eine signifikant höhere Variabilität als für die 2. Phase (Abb. III.2).

### *3.1.4 Konzentrationsabhängigkeit*

Die niedrigste Adrenalin-Konzentration, die eine signifikante Isc-Antwort in beiden Phasen hervorrief, betrug distal  $5\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $n = 8$ ) und proximal  $5\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $n = 6$ ). Die 2. Phase des Effekts von Adrenalin, d. h. der Abfall des Kurzschlußstroms, zeigte eine relativ flache Konzentrations-Wirkungsbeziehung. Ein ausgeprägter Isc-Anstieg konnte jedoch erst bei einer Zugabe von  $5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Adrenalin beobachtet werden (Abb. III.3). Eine Erhöhung der Konzentration auf  $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  brachte keine weitere Vergrößerung der Antwort (Daten nicht gezeigt).

Alle weiteren Versuche wurden deshalb mit einer Adrenalin-Konzentration von  $5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  durchgeführt, um in beiden Phasen der Antwort auf Adrenalin einen deutlichen Effekt zu erzielen.

## Die Konzentrationsabhängigkeit der Isc-Änderung nach Adrenalin:



**Abb. III.3:** Die Schwelle für einen signifikanten Effekt in beiden Phasen liegt bei  $5 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$  im distalen und bei  $5 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  im proximalen Segment. Die Werte sind Mittelwerte (Quadrate)  $\pm$  SEM (vertikale Linien).  $n = 6 - 8$ .

### 3.1.5 Desensitivierung

Wurde Adrenalin zu ein und demselben Gewebe wiederholt, mit jeweils zwischengeschaltetem Auswaschen, zugegeben, wurde eine Verkleinerung der Antwort von Zugabe zu Zugabe deutlich, die allerdings nur in der 2. Phase im distalen Segment signifikant war ( $n = 6$ ; Tab. 2). Daraus geht hervor, daß Adrenalin am Colon der Ratte zu einer Desensitivierung des Gewebes führt. Um

einen Einfluß dieses Desensitivierungseffekts auf die Ergebnisse der übrigen Versuche mit Adrenalin auszuschließen, wurde in der Folge grundsätzlich nur einmal pro Gewebe und Versuch Adrenalin zugesetzt, und es wurden alle Effekte von Blockern mit einer parallel durchgeführten, unabhängigen Kontrollgruppe verglichen.

Tabelle 2: Desensibilisierung bei wiederholter Adrenalin-Zugabe:

	Distales Colon		Proximales Colon		n
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	
$\Delta \text{Isc} (\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$					
1. Zugabe	0,1 ± 0,1	-0,7 ± 0,2*	0,2 ± 0,1*	-0,6 ± 0,2*	6
2. Zugabe	0,0 ± 0,0	-0,3 ± 0,1*	0,1 ± 0,0*	-0,4 ± 0,1*	6
3. Zugabe	0,1 ± 0,1	-0,2 ± 0,0*#	0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,1*	6

Effekt bei wiederholter Zugabe von Adrenalin ( $5\cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  serosal) zu demselben Gewebe auf den Isc. Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM. \*  $p < 0,05$  versus Baseline; #  $p < 0,05$  versus erste Zugabe.

Die Beobachtung, daß nicht alle Gewebe die zu erwartende Isc-Antwort aufwiesen und daß Adrenalin einen Desensitivierungseffekt am Rattencolon ausübte, führte zu der Frage, ob dies mit dem Streß der Versuchstiere vor der Tötung zur Entnahme des Darms und dem damit verbundenen, individuell unterschiedlich erhöhten endogenen Adrenalin Spiegel in Zusammenhang stand. Daher wurde eine Kontrollversuchsserie mit Tieren durchgeführt, die, anders als die sonst verwendeten, ab der Geburt an alle mit der Versuchsvorbereitung verbundenen Umstände (Entnahme aus dem Gruppenkäfig, Wiegen, Transport, Aufenthalt im Labor etc.) gewöhnt worden waren. Diese „gehandelten“ Ratten zeigten daraufhin auch bis unmittelbar vor Versuchsbeginn keine der sonst auftretenden Streßreaktionen (Erschrecken, Fluchtversuche, „Streßputzen“ u.ä.).

Dieser Zusammenhang konnte nicht bestätigt werden; die Reaktionen dieser Gewebe auf Adrenalinzugabe unterschieden sich nicht von den sonst gefundenen (Tab. 3).

Tabelle 3: Adrenalin-Effekt auf die elektrischen Parameter bei Verwendung der „gehandelten“ Ratten:

	Distales Colon		Proximales Colon		n
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	
$\Delta I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$0,0 \pm 0,1$	$-0,6 \pm 0,1^*$	$0,3 \pm 0,1$	$-0,3 \pm 0,2$	5-6
$\Delta G_t$ ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$0,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,4$	5-6

$I_{sc}$  und  $G_t$  sind angegeben als Änderung der Parameter ( $\Delta$ ) im Vergleich zur Baseline unmittelbar vor Zugabe von Adrenalin ( $5\cdot 10^{-6}$  mol $\cdot\text{l}^{-1}$  serosal). Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  versus Baseline.

### 3.2 Ionale Abhängigkeit des Adrenalin-Effekts

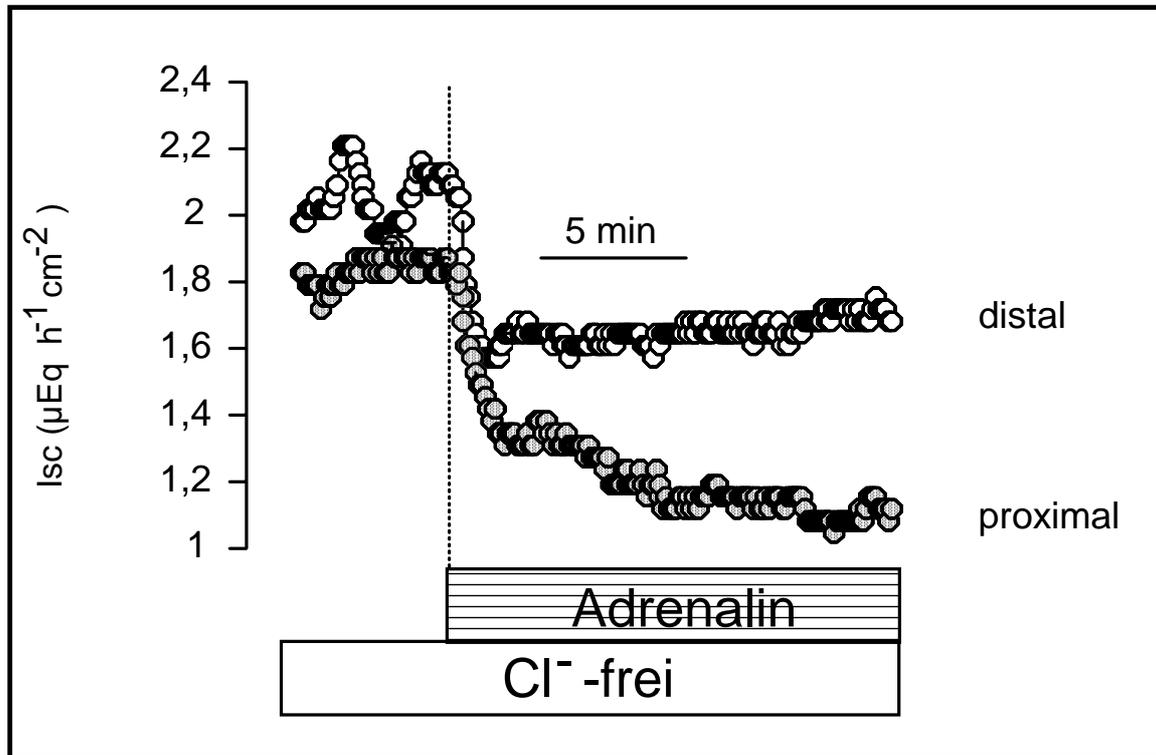
#### 3.2.1 Anionensubstitutionsversuche und Wirkung von Transportinhibitoren

Um zu überprüfen, ob der Stromanstieg während der ersten Phase wie im Meerschweinchencolon (Rechkemmer et al., 1996) durch eine  $\text{Cl}^-$ -Sekretion verursacht wird, wurde zunächst die Abhängigkeit der Adrenalin-Wirkung von der Anwesenheit von Chlorionen getestet. Unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen war in beiden Colon-Segmenten nach Zusetzen von Adrenalin kein Stromanstieg zu beobachten ( $n = 8$ ). Die 2. Phase der Adrenalin-Antwort blieb dagegen unverändert (Tab. 4; Abb. III.4).

Die Phase 1 der Isc-Änderung durch Adrenalin ist Folge

der Auslösung einer  $\text{Cl}^-$ -Sekretion.

- Ionensubstitutionsversuche:



**Abb. III.4:** Unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen fehlt die Phase 1 der Isc-Antwort auf Adrenalin vollständig. Die Kurvenverläufe sind repräsentativ für 8 Versuche unter gleichen Bedingungen.

Auf der basolateralen Seite des Gewebes ist der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -2  $\text{Cl}^-$ -Cotransporter der wesentliche Faktor für die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion, d. h. für die Aufnahme von  $\text{Cl}^-$  in die Zelle (Chipperfield, 1986). Dementsprechend fehlte auch nach Vorbehandlung mit Bumetanid ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  serosal), einem Hemmer des  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -2  $\text{Cl}^-$ -Cotransporters (Cabantchik und Greger, 1992), der Isc-Anstieg. In diesem Fall war allerdings auch die Senkung des Kurzschlußstroms reduziert (n = 7; Tab. 4; Abb. III.5).

transporters Bumetanid:

Die Phase 1 der Isc-Aenderung durch Adrenalin ist Folge der Auslösung einer Cl<sup>-</sup>-Sekretion.

- Versuche mit dem Blocker des Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2 Cl<sup>-</sup>-Co-transporters Bumetanid:

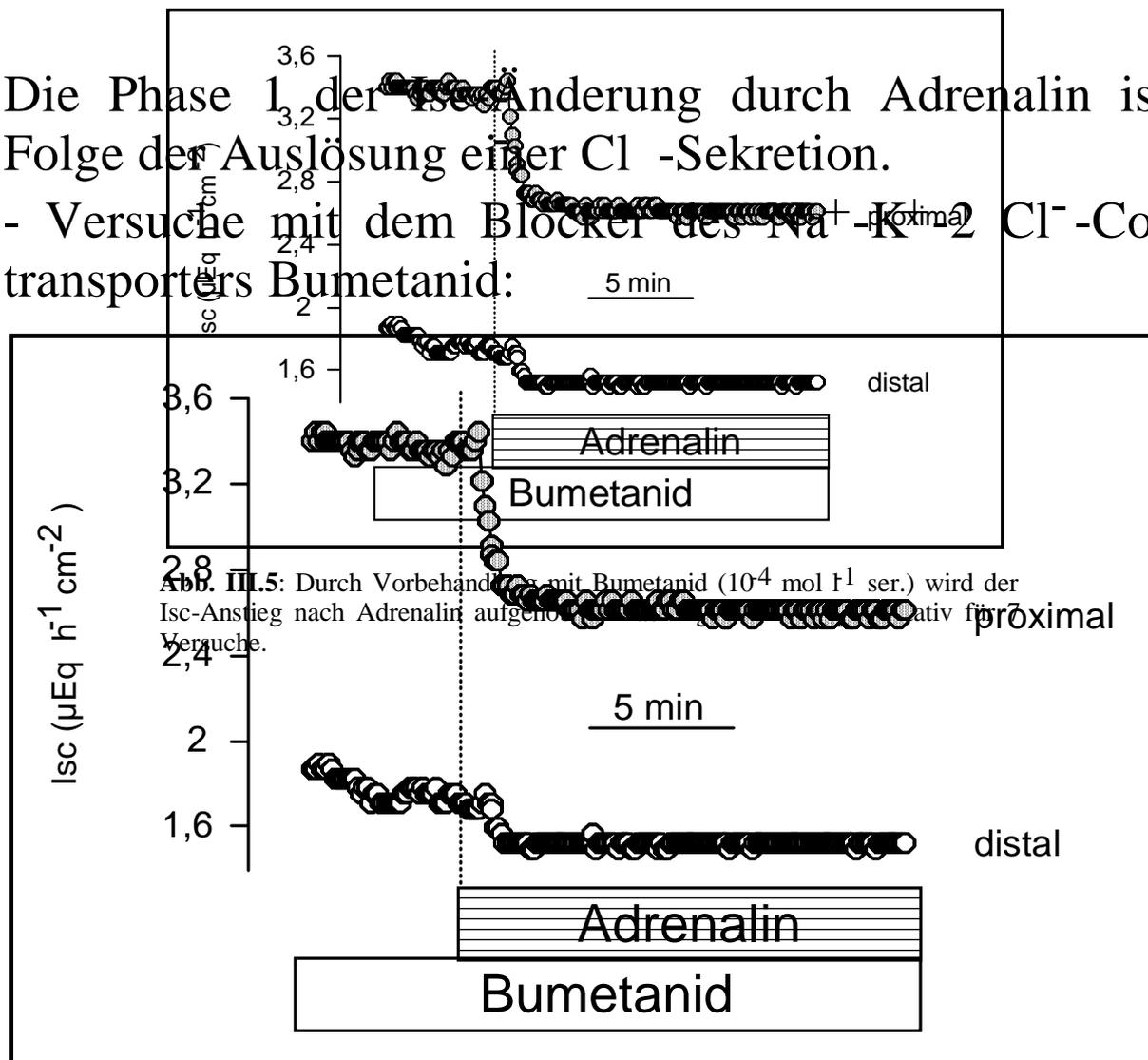


Abb. III.5: Durch Vorbehandlung mit Bumetanid ( $10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> ser.) wird der Isc-Anstieg nach Adrenalin aufgehoben. Das Ergebnis ist repräsentativ für 7 Versuche.

Abb. III.5: Durch Vorbehandlung mit Bumetanid ( $10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> ser.) wird der Isc-Anstieg nach Adrenalin aufgehoben. Das Ergebnis ist repräsentativ für 7 Versuche.

Desweiteren wurde überprüft, ob die Isc-Absenkung der 2. Phase auf eine K<sup>+</sup>-Sekretion zurückgeht, wie es im Colon von Kaninchen (Smith und McCabe, 1986) und Meerschweinchen (Rechkemmer et al., 1996) der Fall ist. Die Vorbehandlung mit dem K<sup>+</sup>-Kanal-Blocker Quinin ( $10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal; Cook und Quast, 1990) beeinflusste die 1. Phase nicht, hemmte aber wiederum die 2. Phase partiell (n = 5 - 6). Tetraethylammonium ( $5 \cdot 10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal; Cook und Quast, 1990), ein weiterer K<sup>+</sup>-Kanal-Blocker, war unwirksam (n = 6; Tab. 4; Abb. III.6).

Tabelle 4: Wirkung von Anionen-Ersatz oder Transportinhibitoren auf den Adrenalin-Effekt:

	Distales Colon		Proximales Colon		n
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	
$\Delta$ Isc ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )					
Cl <sup>-</sup> -frei	0,0 ± 0,0	-0,5 ± 0,1*	0,0 ± 0,0	-0,6 ± 0,1*	8
Kontrolle	0,6 ± 0,3	-0,5 ± 0,2*	0,5 ± 0,2*	-0,7 ± 0,1*	6
Bumetanid	0,1 ± 0,0*#	-0,1 ± 0,0*	0,1 ± 0,0#	-0,3 ± 0,1*	7
Kontrolle	0,2 ± 0,1	-0,6 ± 0,3	0,3 ± 0,2	-0,5 ± 0,2*	5-7
Quinin	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1*#	0,0 ± 0,0	-0,1 ± 0,2	5-7
Kontrolle	0,1 ± 0,1	-0,7 ± 0,2*	0,2 ± 0,1*	-0,7 ± 0,1*	6
TEA	-0,1 ± 0,1	-0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,1	-0,8 ± 0,1*	6

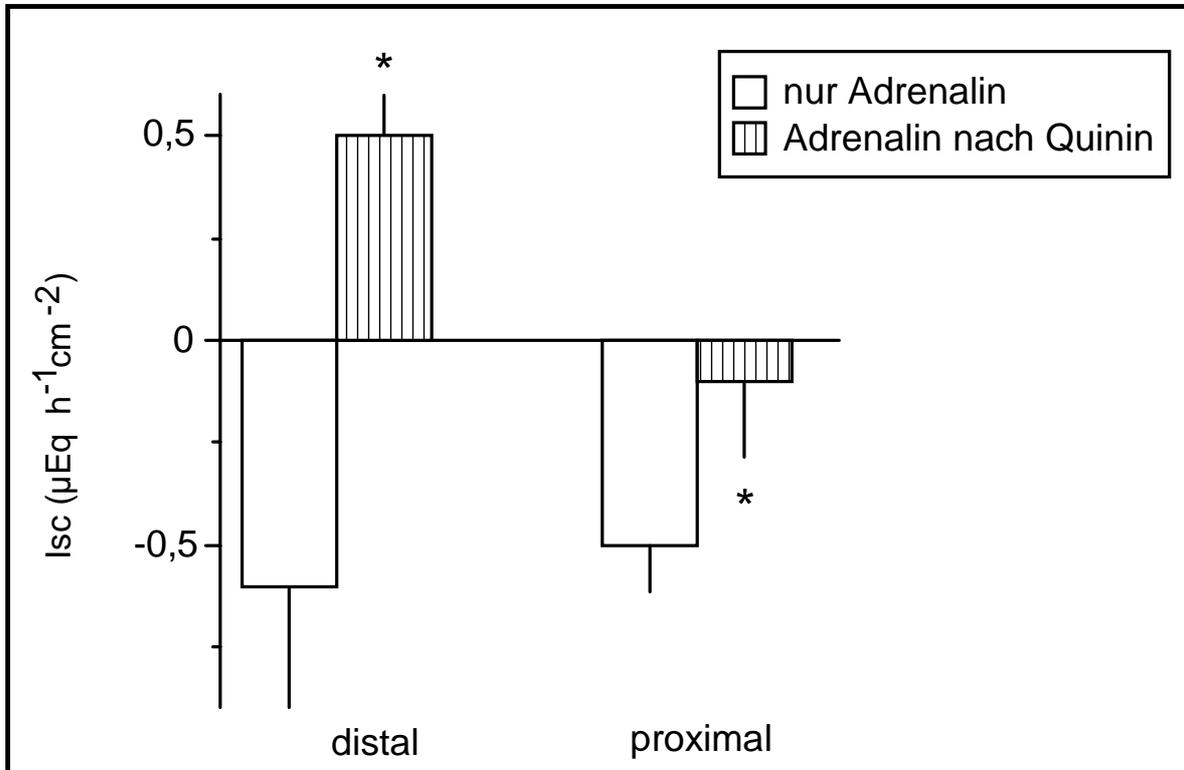
Effekt von Adrenalin ( $5\cdot 10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal) in Cl<sup>-</sup>-freier Nährlösung oder in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Bumetanid ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal), TEA ( $5\cdot 10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) und Quinin ( $10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM. \* p < 0,05 versus Baseline; # p < 0,05 versus Kontrolle.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die 1. Phase der Isc-Änderung nach Adrenalin auf eine Cl<sup>-</sup>-Sekretion zurückzuführen ist, während der 2. Phase eine K<sup>+</sup>-Sekretion zugrundeliegt.

Der Abfall des Isc trat unter Cl<sup>-</sup>-freien Bedingungen mit einer Halbwertszeit von  $52 \pm 5$  s distal (n = 8) bzw.  $92 \pm 23$  s proximal (n = 8) deutlich schneller als unter Kontrollbedingungen ein, wobei allerdings proximal die Signifikanz des Unterschieds verfehlt wurde. Dies zeigt, daß die für die Stromsenkung verantwortliche K<sup>+</sup>-Sekretion schon unmittelbar nach Adrenalinzugabe einsetzt, aber in der 1. Phase der Reaktion von einer kurzfristigen, größeren Cl<sup>-</sup>-Sekretion überlagert wird.

Die Phase 2 der Isc-Änderung durch Adrenalin ist Folge einer Steigerung der Kaliumsekretion.

- Versuche mit dem K<sup>+</sup>-Kanal-Blocker Quinin:



**Abb. III.6:** Der Kaliumkanal-Blocker Quinin ( $10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup> muc.) unterdrückt die Stromsenkung durch Adrenalin bzw. kehrt sie im distalen Colon um. Die Werte sind Mittelwerte (Säulen)  $\pm$  SEM (vertikale Linien). \*  $p < 0,05$  versus Adrenalin-Effekt unter Kontrollbedingungen.  $n = 5 - 6$ .

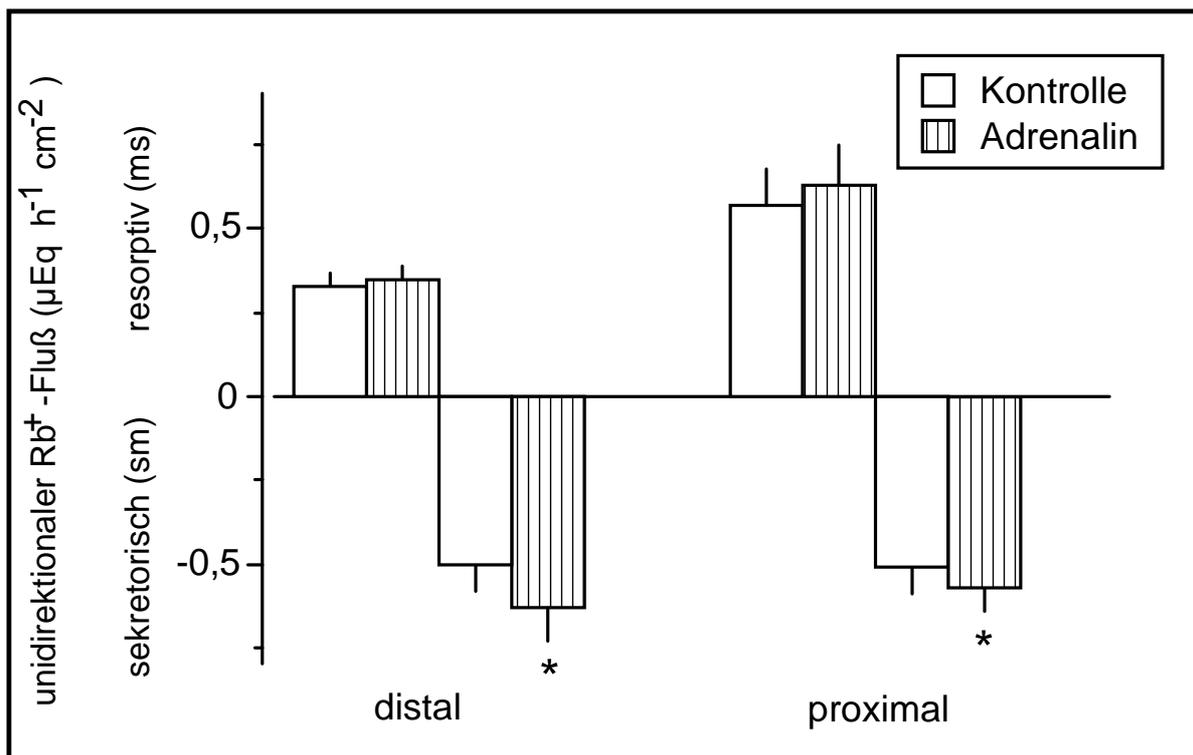
### 3.2.2 Messung unidirektionaler K<sup>+</sup>-Flüsse

Um die dem Stromeffekt von Adrenalin zugrundeliegenden Veränderungen in den Bewegungen der einzelnen Ionen direkt zu erfassen, wurden Messungen unidirektionaler Ionenflüsse durchgeführt. Diese erfolgten während einer 20-minütigen Kontrollperiode sowie während einer zweiten, gleichlangen Periode, die 5 Minuten nach Adrenalin-Zugabe begann. Die Ionenfluß-Änderungen während des kurzdauernden Isc-Anstiegs wurden somit nicht erfaßt.

Bei der Messung des unidirektionalen  $^{86}\text{Rb}^+$ -Flusses, als Marker für den  $\text{K}^+$ -Transport, wurde eine spontane Netto-Sekretion im distalen und keine signifikante Netto- $\text{Rb}^+$ -Bewegung im proximalen Segment ermittelt ( $n = 9 - 10$ ). Durch Adrenalin wurde in beiden Segmenten der sekretorische  $\text{Rb}^+$ -Fluß ( $\text{JRb}_{\text{sm}}$ ,  $n = 9 - 10$ ,  $p < 0,05$ ; Tab. 5; Abb. 7) stimuliert. Damit wurde die Annahme aus den Versuchen mit Quinin und Bumetanid bestätigt, daß der Isc-Abfall mit einer  $\text{K}^+$ -Sekretion einhergeht.

Die Phase 2 der Isc-Änderung durch Adrenalin ist Folge einer Steigerung der Kaliumsekretion.

- Unidirektionale  $\text{Rb}^+$ -Fluß-Messungen:



**Abb. III.7:** Unidirektionale Ionenfluß-Messungen mit  $^{86}\text{Rb}^+$  als Marker für Kalium. Die Stromsenkung durch Adrenalin (Phase 2) geht mit einem signifikanten Anstieg der Kaliumsekretion einher. Die Werte sind Mittelwerte (Säulen)  $\pm$  SEM (vertikale Linien). \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle.  $n = 9 - 10$ .

Tabelle 5: Wirkung von Adrenalin auf unidirektionale und Nettoflüsse von  $Rb^+$  im distalen und proximalen Colon:

	$JRb_{ms}$	$JRb_{sm}$	$JRb_{net}$	Isc	Gt
	( $\mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$ )				( $mS \cdot cm^{-2}$ )
<b>Distales Colon</b>					
Kontrolle	$0,33 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,08$	$-0,17 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,4$
Adrenalin	$0,35 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,1^*$	$-0,28 \pm 0,11$	$0,8 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,4$
<b>Proximales Colon</b>					
Kontrolle	$0,57 \pm 0,11$	$0,51 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,14$	$1,1 \pm 0,1$	$22,6 \pm 3,2$
Adrenalin	$0,63 \pm 0,12$	$0,57 \pm 0,07^*$	$0,06 \pm 0,14$	$0,7 \pm 0,1^*$	$22,4 \pm 3,3$

Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 9 - 10$ , \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle.

### 3.2.3 Messung unidirektionaler $Na^+$ - und $Cl^-$ -Flüsse

In beiden Colon-Segmenten erfolgte spontan sowohl eine Netto- $Na^+$ - als auch Netto- $Cl^-$ -Resorption ( $n = 8$ ; Tab. 5). In der Testperiode nach Adrenalin nahm distal der Mucosa-nach-Serosa- ( $JCl_{ms}$ ) wie auch der Serosa-nach-Mucosa- $Cl^-$ -Fluß von  $Cl^-$  ( $JCl_{sm}$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ) ab; proximal blieb er unverändert. Umgekehrt stieg proximal, nicht aber distal, der  $JNa_{sm}$  an ( $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ; Tab. 6). Für die Nettobewegungen beider Ionen ergaben sich daraus jedoch keine signifikanten Veränderungen. Adrenalin verändert die  $Na^+$ - und  $Cl^-$ - Transporte also nur marginal.

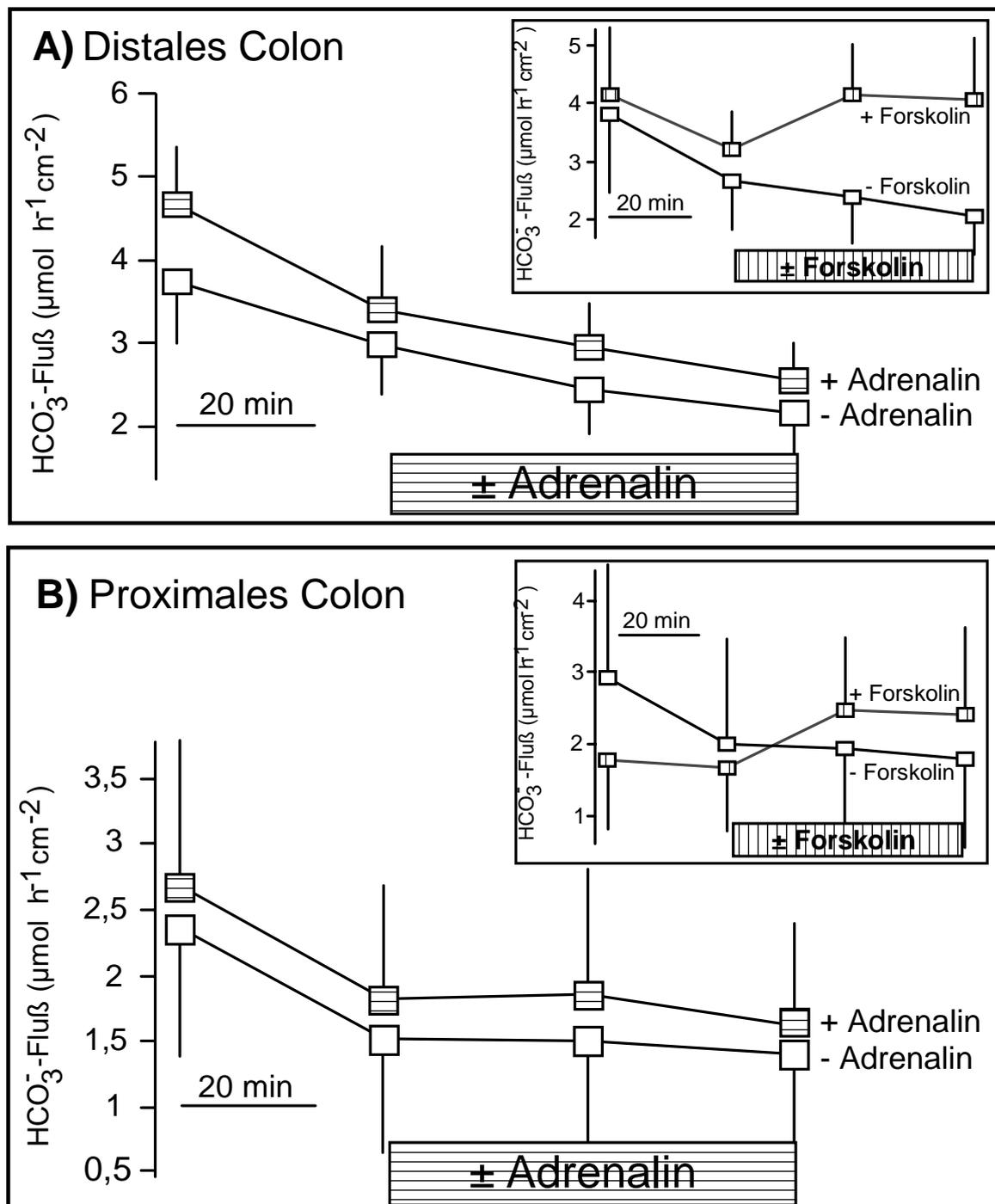
Tabelle 6: Wirkung von Adrenalin auf unidirektionale und Nettoflüsse von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> im distalen und proximalen

Colon:

	J <sub>Na<sub>ms</sub></sub>	J <sub>Na<sub>sm</sub></sub>	J <sub>Na<sub>net</sub></sub>	J <sub>Cl<sub>ms</sub></sub>	J <sub>Cl<sub>sm</sub></sub>	J <sub>Cl<sub>net</sub></sub>	J <sub>R<sub>net</sub></sub>	I <sub>sc</sub>	G <sub>t</sub>
	(μEq·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )								
<b>Distales Colon</b>									
Kontrolle	12,4 ± 0,9	6,0 ± 0,6	6,3 ± 1,1	15,4 ± 1,5	10,6 ± 0,7	4,8 ± 1,6	-0,4 ± 2,0	1,1 ± 0,2	12,0 ± 0,8
Adrenalin	13,2 ± 1,0	6,6 ± 0,5	6,6 ± 1,2	12,7 ± 1,7*	7,7 ± 1,0*	5,1 ± 2,0	-0,8 ± 2,3	0,7 ± 0,2*	11,6 ± 0,6
<b>Proximales Colon</b>									
Kontrolle	17,5 ± 1,3	6,6 ± 0,7	10,8 ± 1,5	19,7 ± 1,7	16,1 ± 1,2	3,6 ± 2,0	-5,9 ± 2,5	1,3 ± 0,1	16,6 ± 1,8
Adrenalin	17,4 ± 1,2	7,1 ± 0,8*	10,3 ± 1,5	19,8 ± 1,5	15,5 ± 1,1	4,3 ± 1,9	-4,9 ± 2,4	1,1 ± 0,1*	17,3 ± 1,9*

Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM, n = 8, \* p < 0.05 versus Kontrolle.

Der sekretorische Bicarbonat-Transport wird durch Adrenalin nicht verändert:



**Abb. III.8:** Titrimetrische Bestimmung des sekretorischen Bicarbonat-Transports (Alkalinisierung einer pufferfreien Elektrolytlösung auf der mucosalen Gewebeseite). ± Adrenalin: n = 11 - 15.

In Vergleichsversuchen mit dem Sekretagonon Forskolin ließ sich dagegen eine signifikante Steigerung der Transportrate nachweisen. n = 6 - 7.

Alle Werte sind Mittelwerte (Quadrate) ± SEM (vertikale Linien).

### 3.2.4 Messung sekretorischer $\text{HCO}_3^-$ -Flüsse

Es wurde untersucht, ob parallel zu der durch Adrenalin induzierten  $\text{K}^+$ -Sekretion auch eine Veränderung des sekretorischen Bicarbonat-Transports stattfand. Als indirekter Parameter für die  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion wurde dazu der pH-Anstieg der ungepufferten, Bicarbonat-freien mucosalen Elektrolytlösung über Titration mit  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl-Lösung gemessen (Stewart et al., 1989).

Die Bestimmung des  $\text{J}^{\text{HCO}_3}_{\text{sm}}$  ergab eine spontane Bicarbonat-Sekretion, die über den Versuchszeitraum von 2 h allmählich abnahm ( $n = 11 - 14$ ). Adrenalin beeinflusste diesen Verlauf, und damit den sekretorischen Bicarbonat-Transport, nicht ( $n = 13 - 15$ ; Abb. III.8).

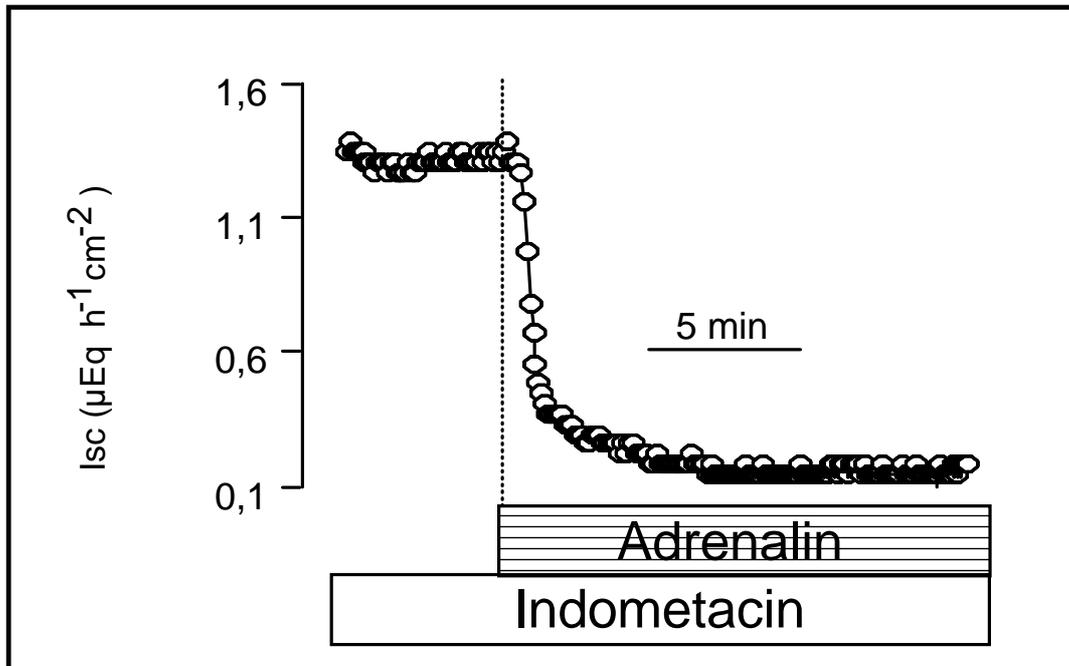
Zur Überprüfung der verwendeten Meßmethodik wurden Vergleichsversuche mit dem Sekretagon Forskolin ( $5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  mucosal und serosal) durchgeführt, einem Aktivator der Adenylatcyclase (Seamon et al., 1981). Damit konnte bei gleichem Versuchsprotokoll eine deutliche  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion - hier über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts - ausgelöst werden ( $n = 6 - 7$ ; Abb. III.8).

Demnach wirkt Adrenalin nicht auf diesen intrazellulären Regulationsmechanismus des sekretorischen  $\text{HCO}_3^-$ -Transports ein.

### 3.3 Beteiligung subepithelialer Strukturen

Die Wirkung vieler Sekretagona erfolgt indirekt über eine Zwischenschaltung von Neuronen des enteralen Nervensystems oder von Eicosanoiden. Um dies für die Wirkungsweise von Adrenalin zu untersuchen, wurden Inhibitoren dieser beiden Wege eingesetzt. Durch Vorbehandlung des Gewebes mit Indometacin ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  mucosal und serosal), einem Cyclooxygenase-Hemmer (Curtis-Prior, 1976), wurde im distalen Colon-Segment der Isc-Anstieg aufgehoben ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$  versus Kontrolle). Der Isc-Abfall blieb distal unverändert (Tab. 7; Abb. III.9).

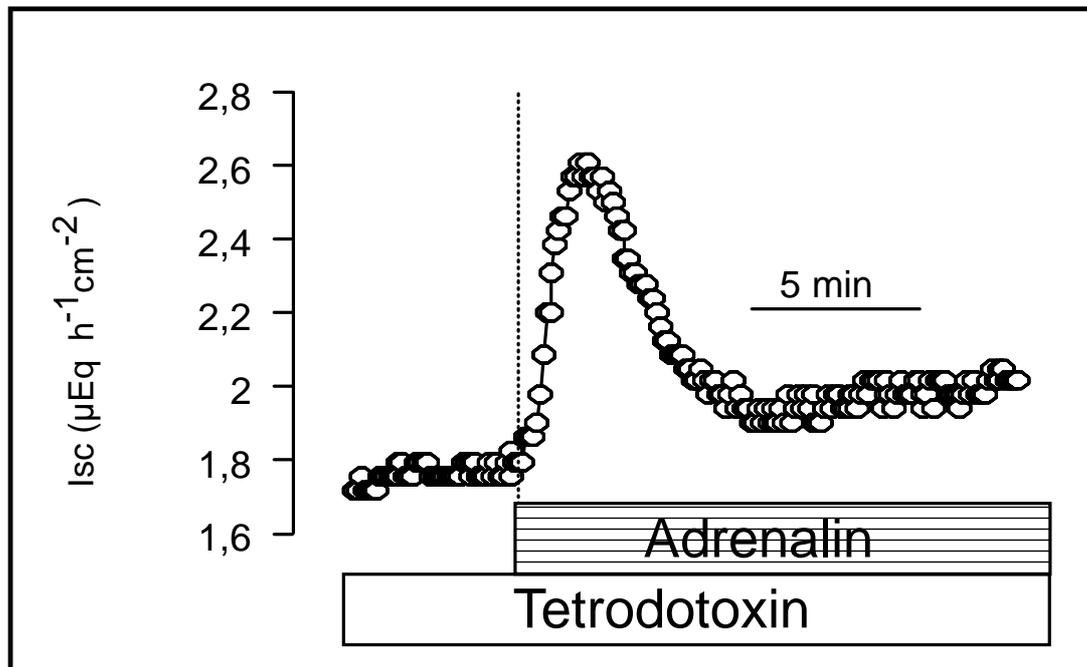
Am distalen Colon wirkt Adrenalin indirekt; die 1. Phase der Isc-Änderung wird über Prostaglandine vermittelt:



**Abb. III.9:** Der Cyclooxygenase-Blocker Indometacin ( $10^{-6}$  mol l<sup>-1</sup> muc. + ser.) hebt die 1. Phase der Isc-Antwort auf Adrenalin auf. Der Verlauf der Kurve ist typisch für 6 Versuche.

Das Neurotoxin des Kugelfischs, Tetrodotoxin (Catterall, 1980) ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal), hemmte dagegen distal die 2. Phase, ohne die 1. Phase zu beeinflussen (n = 6, p < 0,05 versus Kontrolle; Tab. 7; Abb. III.10). Beide Substanzen waren am proximalen Segment unwirksam (n = 6). Daraus geht hervor, daß die Wirkung von Adrenalin am distalen Colon indirekt, in der 1. Phase durch Prostaglandine, in der 2. Phase über enterale Neurone, vermittelt wird, während der Effekt am proximalen Colon direkt an den Enterozyten ausgelöst wird.

Enterale Neurone vermitteln die 2. Phase des Adrenalin-Effekts am distalen Colon:



**Abb. III.10:** Der Adrenalin-induzierte Isc-Abfall wird durch das Neurotoxin Tetrodotoxin ( $5 \times 10^{-6}$  mol l<sup>-1</sup> ser.) aufgehoben. Der Effekt ist repräsentativ für 6 Versuche unter gleichen Bedingungen.

Hier stellte sich die Frage, ob die weitere Übermittlung der Adrenalin-Wirkung am distalen Colon cholinerg oder nicht-cholinerg erfolgt. Versuche mit cholinergen Antagonisten brachten folgende Ergebnisse: Eine Vorbehandlung mit dem Blocker nicotinerger Rezeptoren Hexamethonium (Tapper und Lewand, 1981) ( $10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal) verkleinerte die Isc-Senkung distal ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$  versus Kontrolle), ohne den Isc-Anstieg zu verändern (Tab. 7). Atropin ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal), ein Blocker muscarinerger Rezeptoren (Kaiser und Rzeszotarski, 1987), war wirkungslos ( $n = 6$ ; Tab. 7). Dies deutet auf eine Beteiligung von nicotinerger Rezeptoren bei der Vermittlung des Adrenalin-Effekts am distalen Colon hin, allerdings ohne eine direkte Einwirkung von Acetylcholin auf die Epithelzellen des Colons über muscarinerge Rezeptoren.

Wie aus den Versuchen mit Tetrodotoxin zu erwarten, waren alle diese Inhibitoren am proximalen Colon unwirksam (n = 6; Tab. 7).

Tabelle 7: Vermittlung der Adrenalin-Antwort durch Prostaglandine und enterische Neurone:

	Distales Colon		Proximales Colon		n
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	
	$\Delta \text{Isc} (\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$				
Kontrolle	$0,6 \pm 0,3$	$-1,0 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$	$-0,5 \pm 0,2^*$	6
Indometacin	$0,0 \pm 0,0\#$	$-0,8 \pm 0,1^*$	$0,3 \pm 0,0^*$	$-0,2 \pm 0,2$	6
Kontrolle	$0,2 \pm 0,1$	$-1,4 \pm 0,2^*$	$0,4 \pm 0,1^*$	$-0,5 \pm 0,2$	6
Tetrodotoxin	$0,3 \pm 0,1^*$	$-0,1 \pm 0,1\#$	$0,4 \pm 0,1^*$	$-0,4 \pm 0,1^*$	6
Kontrolle	$0,0 \pm 0,0$	$-1,2 \pm 0,1^*$	$0,4 \pm 0,2$	$-0,8 \pm 0,3^*$	6
Hexamethonium	$0,1 \pm 0,0$	$-0,6 \pm 0,1^*\#$	$0,3 \pm 0,1^*$	$-0,3 \pm 0,2$	6
Kontrolle	$0,1 \pm 0,0^*$	$-0,4 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,1^*$	$-0,8 \pm 0,1^*$	6-8
Atropin	$0,2 \pm 0,0^*$	$-0,9 \pm 0,2^*$	$0,3 \pm 0,1^*$	$-0,8 \pm 0,2^*$	6

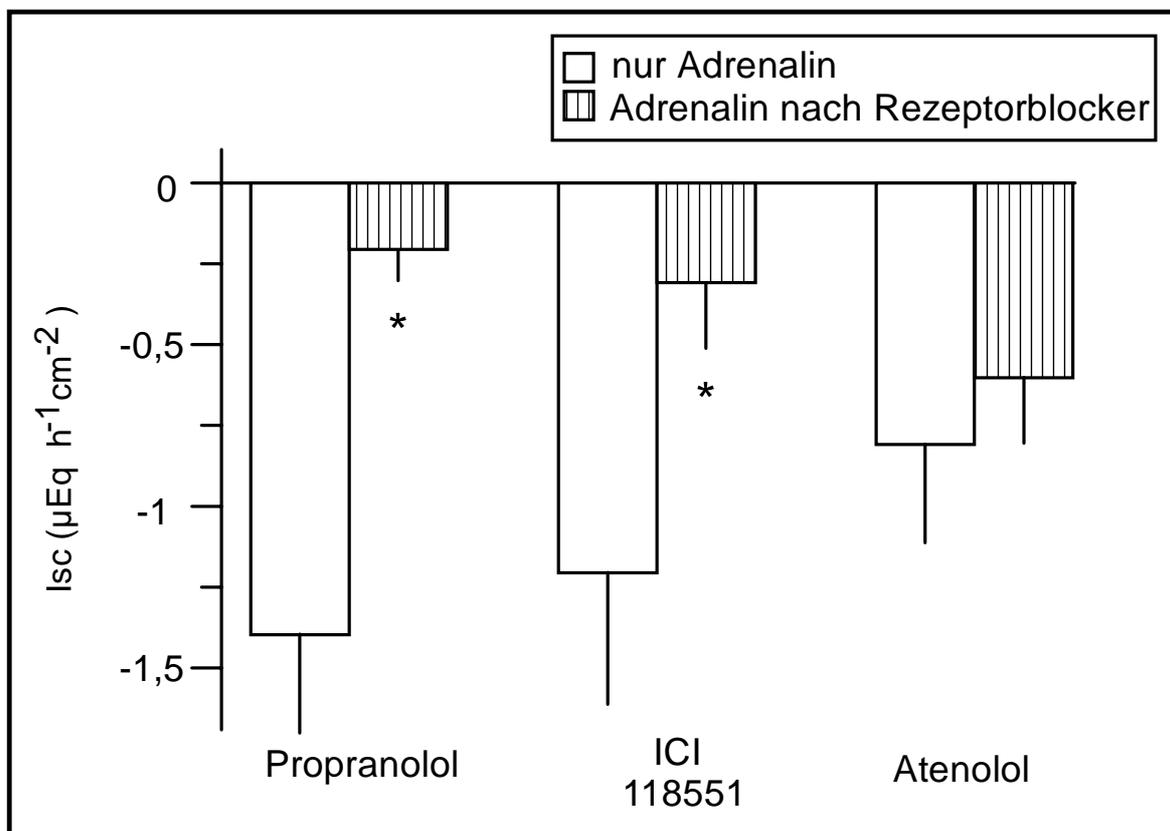
Wirkung von Adrenalin ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Indometacin ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  mucosal und serosal), Tetrodotoxin ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal), Hexamethonium ( $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal), oder Atropin ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal). Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* p < 0,05 versus Baseline; # p < 0,05 versus Kontrolle.

### 3.4 Differenzierung der adrenergen Rezeptoren

Die Beteiligung und mögliche Lokalisation verschiedener adrenerger Rezeptoren an der Vermittlung der Wirkung von Adrenalin wurde durch den Einsatz diverser Rezeptorblocker getestet. Wurden die Gewebe mit Propranolol ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal), einem unselektiven  $\beta$ -Rezeptor-Blocker (zu allen Adrenozeptor-Blockern s. a. Bylund et al., 1994), vorbehandelt, war der

Kurzschlußstrom-Abfall im distalen Segment verkleinert ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$  versus Kontrolle). Der selektive  $\beta_2$ -Blocker ICI 118551 ( $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal) rief denselben Effekt hervor ( $n = 7$ ,  $p < 0,05$  versus Kontrolle); der  $\beta_1$ -Blocker Atenolol ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal) hatte dagegen keinen Einfluß auf die Adrenalin-Antwort ( $n = 6$ ). Im proximalen Segment war keiner der  $\beta$ -Blocker wirksam ( $n = 6$ ; Tab. 8; Abb. III.11).

### Adrenalin induziert eine Kaliumsekretion am distalen Colon über $\beta_2$ -Rezeptoren auf enteralen Neuronen:



**Abb. III.11:** Der nicht-selektive  $\beta$ -Rezeptor-Blocker Propranolol ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  ser.) und der selektive  $\beta_2$ -Rezeptor-Blocker ICI 118551 ( $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  ser.) hemmen die Stromsenkung durch Adrenalin am distalen Colon.  $n = 5 - 7$ .

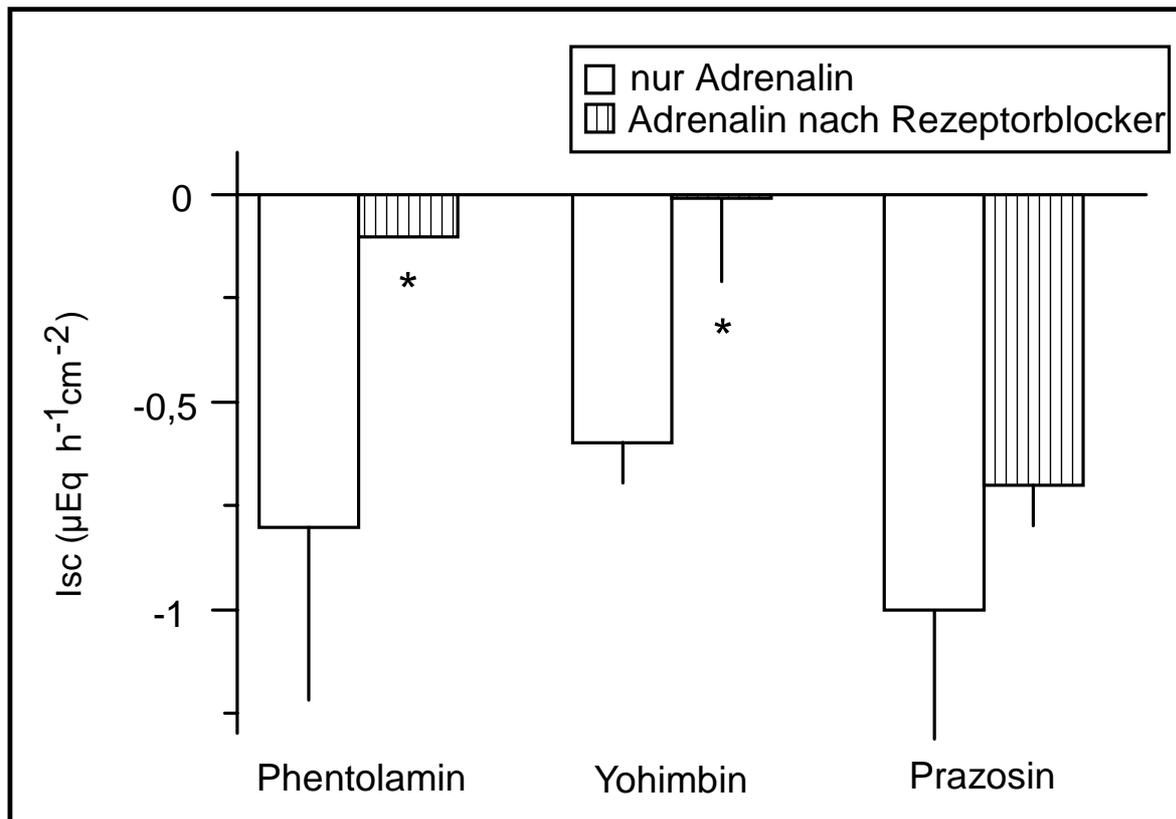
Der selektive  $\beta_1$ -Blocker Atenolol ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  ser.) hat keinen Einfluß auf

den Isc-Abfall.  $n = 6$ .

Die Werte sind Mittelwerte (Säulen)  $\pm$  SEM (vertikale Linien). \*  $p < 0,05$  versus Adrenalin-Effekt unter Kontrollbedingungen.

Eine Vorbehandlung mit dem nicht-selektiven  $\alpha$ -Rezeptor-Blocker Phentolamin ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal), wie auch mit dem  $\alpha_2$ -Blocker Yohimbin ( $10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal), hemmte umgekehrt die 2. Phase der Isc-Änderung nach Adrenalin im proximalen, nicht aber im distalen Colon-Abschnitt (n = 6, p < 0,05 versus Kontrolle). Prazosin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal), ein  $\alpha_1$ -Blocker, veränderte die Adrenalin-Antwort nicht (n = 6 - 7; Tab. 8; Abb. III.12).

Am proximalen Colon induziert Adrenalin eine Kaliumsekretion über  $\alpha_2$ -Rezeptoren wahrscheinlich auf Epithelzellen:



**Abb. III.12:** Der nicht-selektive  $\alpha$ -Rezeptor-Blocker Phentolamin ( $10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> ser.) sowie der selektive  $\alpha_2$ -Rezeptor-Blocker Yohimbin ( $10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup> ser.) heben die Isc-Senkung durch Adrenalin am proximalen Colon auf. n = 5 - 6.

Der selektive  $\alpha_1$ -Blocker Prazosin ( $10^{-6}$  mol l<sup>-1</sup> ser.) beeinflusst die Isc-Senkung nicht. n = 5 - 6.

Die Werte sind Mittelwerte (Säulen)  $\pm$  SEM (vertikale Linien). \* p < 0,05 versus Adrenalin-Effekt unter Kontrollbedingungen.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß am distalen Colon  $\beta_2$ -Rezeptoren an der Vermittlung der 2. Phase der Adrenalin-Wirkung beteiligt sind, am proximalen Colon dagegen  $\alpha_2$ -Rezeptoren.

Tabelle 8: Effekt von Adrenalin auf den Isc in Abwesenheit und Anwesenheit von Blockern adrenerger Rezeptoren:

	Distales Colon		Proximales Colon		n
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	
$\Delta$ Isc ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )					
Kontrolle	$0,1 \pm 0,2$	$-0,7 \pm 0,2^*$	$0,3 \pm 0,2$	$-0,8 \pm 0,4$	6
Phentolamin	$0,9 \pm 0,1^{*\#}$	$-0,5 \pm 0,1^*$	$0,8 \pm 0,1^*$	$-0,1 \pm 0,0\#$	6
Kontrolle	$0,1 \pm 0,1$	$-1,0 \pm 0,3^*$	$0,1 \pm 0,1$	$-0,6 \pm 0,2$	5-7
Prazosin	$0,2 \pm 0,0^*$	$-0,7 \pm 0,1^*$	$0,1 \pm 0,1$	$-1,2 \pm 0,1^{*\#}$	5-7
Kontrolle	$0,2 \pm 0,2$	$-0,6 \pm 0,2^*$	$0,6 \pm 0,1^*$	$-0,6 \pm 0,1^*$	5
Yohimbin	$0,2 \pm 0,1^*$	$-0,3 \pm 0,1^*$	$0,6 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,2\#$	6
Kontrolle	$0,3 \pm 0,1$	$-1,4 \pm 0,3^*$	$0,2 \pm 0,1^*$	$-0,6 \pm 0,1^*$	6
Propranolol	$0,2 \pm 0,1^*$	$-0,2 \pm 0,1^{*\#}$	$0,2 \pm 0,0^*$	$-0,4 \pm 0,2$	6
Kontrolle	$0,1 \pm 0,1^*$	$-0,8 \pm 0,3^*$	$0,1 \pm 0,1$	$-1,1 \pm 0,2^*$	6
Atenolol	$0,3 \pm 0,3$	$-0,6 \pm 0,2^*$	$0,2 \pm 0,1$	$-0,8 \pm 0,2^*$	6
Kontrolle	$0,2 \pm 0,1$	$-1,2 \pm 0,4^*$	$0,3 \pm 0,1^*$	$-0,5 \pm 0,2^*$	6-7
ICI 118551	$0,3 \pm 0,1^*$	$-0,3 \pm 0,2\#$	$0,2 \pm 0,1^*$	$-0,8 \pm 0,2^*$	6-7

Wirkung von Adrenalin ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Atenolol ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal), ICI 118551 ( $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal), Phentolamin ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal), Prazosin ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal), Propranolol ( $5 \cdot 10^{-6}$  serosal), oder Yohimbin ( $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal). Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  versus Baseline; #  $p < 0,05$  versus Kontrolle.



## IV. Diskussion

Der basale Kurzschlußstrom (Isc) am Colon der Ratte zeigt eine charakteristische Zeitabhängigkeit: Er ist initial hoch und erreicht nach einer raschen abfallenden Phase einen mehr oder minder stabilen Wert, der im Laufe der weiteren Versuchzeit nur noch wenig absinkt. In den hier vorgestellten Versuchen sank der Kurzschlußstrom in der einstündigen Equilibrierungsphase zu Versuchsbeginn (Standard-Parsons-Lösung auf beiden Seiten des Gewebes, kein Zusatz von Substanzen) kontinuierlich von anfangs höheren Werten auf  $3,4 \pm 0,1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  im distalen wie im proximalen Colon (vgl. Nobles et al., 1991). Der initial sehr hohe Strom spiegelt eine starke sekretorische Aktivität der Schleimhaut wider. Diese ist zurückzuführen auf eine anfangs erhöhte Prostaglandinfreisetzung im subepithelialen Gewebe (s. Craven und DeRubertis, 1986). Sie wird durch die mechanischen Einwirkungen beim Präparieren des Darms ausgelöst (Beubler und Juan, 1978) und klingt während der Stabilisierungsphase in der Kammer allmählich ab. Verschiedene Prostaglandine, wie z. B. Prostaglandin E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>α oder I<sub>2</sub>, stimulieren vorübergehend eine via zwischengeschalteten enteralen Neuronen oder direkt am Epithel vermittelte Chlorid-Sekretion (Diener et al., 1988). Dementsprechend läßt sich die Stabilisierungsphase deutlich verkürzen, wenn man die Prostaglandinbildung durch Hemmung der Cyclooxygenase unterdrückt, z. B. mit dem Indolessig-säure-Derivat Indometacin (Nobles et al., 1991; Curtis-Prior, 1976), bzw. wenn man mit dem Neurotoxin Tetrodotoxin die Aktivität sekretomotorischer Neurone des Plexus submucosus hemmt (Andres et al., 1985). Dieses Gift des japanischen Kugelfischs blockiert die spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Kanäle auf Nervenzellen, deren Funktion die Weiterleitung von Aktionspotentialen ist (Catterall, 1995).

Die proximal unter basalen Bedingungen höhere Gewebeleitfähigkeit (Gt) repräsentiert ein in diesem Segment „undichteres“ Epithel (Nobles et al., 1991) und damit eine höhere passive Permeabilität im Vergleich zum distalen Abschnitt. Die Gesamt-Leitfähigkeit des Colonpräparats summiert sich aus der transzellulären und der parazellulären Leitfähigkeit. Erstere wird durch Zellmembraneigenschaften bestimmt, letztere durch die Morphologie der tight junctions in den Interzellulärspalten. Die tight junctions sind Träger der - neben dem Stoff- und Flüssigkeitstransport - zweiten wichtigen Funktion des Epithels: der Bildung einer (Diffusions-) Barriere zwischen Umwelt und Körperinnerem. Sie werden aus Strängen vernetzter Faserbündeln („strands“) gebildet. Diese Fasern sind spezifische, integrale Membranproteine, die jeweils in einander benachbarten Plasmamembranen verankert und im Interzellulärspalt nahe den apicalen Zellpolen nach dem Reißverschlußprinzip ineinander verzahnt sind. Der Unterschied zwischen stärker durchlässigem (distalem) und weniger durchlässigem (proximalem) Epithel kommt dadurch zustande, daß die „dichteren“ tight junctions von mehreren, die „undichteren“ von nur 1 - 2 dieser verzahnten Faserbündel („strands“) gebildet werden (Powell, 1981; Sandle und McGlone, 1987).

Um den Einfluß von Catecholaminen auf die Ionentransport-Verhältnisse im Colon der Ratte zu untersuchen, wurden zunächst die Wirkungen von Adrenalin ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) auf diese basalen elektrischen Parameter ermittelt.

Adrenalin rief eine biphasische Änderung des Isc hervor. Einem kurzen, transienten Anstieg folgte eine anhaltende Isc-Absenkung. Vergleichbare Ergebnisse fanden bereits Racusen und Binder 1979 am Colon der Ratte. Dagegen war am Ileum und am Colon des Kaninchens (Field und McColl, 1973; Smith und McCabe, 1986) wie auch am Colon des Meerschweinchens (Rechkemmer

et al., 1996) nach Adrenalin-Zugabe nur ein Abfall des Kurzschlußstroms zu beobachten.

Die Adrenalin-Wirkung zeigte eine beachtliche Variabilität von Gewebe zu Gewebe. Die 1. Phase der Adrenalin-Antwort war, abhängig vom Segment, lediglich in 70 - 79% der Versuche zu beobachten, ganz anders als die mit 92 - 93% sehr konsistenten Phase 2 (vgl. Abb. III.2). Diese Inkonstanz des Isc-Anstiegs wurde ebenfalls schon von Racusen und Binder (1979) gefunden. Die Hintergründe dieses Phänomens wurden wegen des raschen Abklingens des Effekts nicht näher untersucht.

Im Gegensatz zum Kaninchen-Ileum (Chang et al., 1982) führte die wiederholte Applikation von Adrenalin zu einem Präparat des Rattencolons zu einer Desensitivierung des Gewebes (Tab. 2). Hinter diesem Effekt können vielfältige Mechanismen stehen, die noch nicht vollständig geklärt sind. Die Abschwächung des Effekts kann auf Rezeptorebene erfolgen - z. B. mittels Internalisation von Rezeptoren in die Zelle, über Abbau oder verlangsamte Neusynthese von Rezeptoren - oder auf einer nachgeschalteten Ebene. Zu den hier ansetzenden Mechanismen gehören die Reduktion der Effizienz der Rezeptor-G-Protein-Kopplung, z. B. durch Rezeptor-Phosphorylierung, oder die Reduktion der verfügbaren zyklischen Nukleotide, sowie die Beeinflussung der Aktivität der Adenylatzyklase oder der Phosphodiesterase. Bei dauerhafter  $\beta$ -Rezeptor-Stimulierung ist eine Abnahme der Kapazität zur cAMP-Synthese bekannt, bei  $\alpha$ -Rezeptoren ein Zusammenwirken von Rezeptor-Entkopplung, -Phosphorylierung und -down-regulation (Übersichten bei: Lefkowitz et al., 1990; Ross, 1990).

Es wurde weiterhin ermittelt, welche Modifikationen an den Ionen-transportverhältnissen im Dickdarm den gefundenen Änderungen der elektrischen Parameter zugrundeliegen.

Die 1. Phase der Kurzschlußstrom-Änderung nach Adrenalinzugabe ist am Colon der Ratte auf eine Stimulation der Cl<sup>-</sup>-Sekretion zurückzuführen. Dies ergaben Versuche unter Cl<sup>-</sup>-freien Bedingungen (Abb. III.4) sowie mit Bumetanid. Bumetanid ist ein Derivat einer aromatischen Carbonsäure (Sulfonamid), das zu den Schleifendiuretika zählt. Diese hemmen spezifisch und reversibel den Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2 Cl<sup>-</sup>-Cotransporter (Cabantchik und Gereger, 1992), der in der basolateralen Membran der Colonepithelzellen lokalisiert und maßgeblich am Ablauf eines sekretorischen Cl<sup>-</sup>-Transports der Zelle beteiligt ist (Abb. III.5; Chipperfield, 1986).

Die 2. Phase des Adrenalin-Effekts auf den Isc ist auf eine K<sup>+</sup>-Sekretion zurückzuführen. Dafür spricht z. B. die Beobachtung, daß sich die Senkung des Isc durch Vorbehandlung des Gewebes mit Quinin aufheben ließ. Tetraethylammonium (TEA) hingegen war wirkungslos (Abb. III.7). Sowohl Quinin (= Chinin), das Hauptalkaloid der Chinarinde, als auch die quartäre Ammoniumverbindung TEA blockieren K<sup>+</sup>-Kanäle (Cook und Quast, 1990). Zudem ging diese Phase mit einer Steigerung der Serosa-nach-Mucosa-Flüsse des Markers <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> einher (Abb. III.6, Tab. 7). Sie ist somit auf eine K<sup>+</sup>-Sekretion via apikalen, Quinin-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanälen zurückzuführen, vergleichbar dem Colon von Meerschweinchen (Rechkemmer et al., 1996) und Kaninchen (Smith und McCabe, 1986; Halm, 1984).

Auffällig ist dagegen, daß der Stromabfall nach Adrenalin durch Bumetanid gehemmt wird, nicht aber unter Verwendung von Cl<sup>-</sup>-freiem Puffer (Abb. III.4 und III.5). Für die volle Aufrechterhaltung der K<sup>+</sup>-Sekretion ist die Aufnahme dieses Ions von basolateral über den Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2 Cl<sup>-</sup>-Cotransporter in die Zelle notwendig, und dieser Vorgang ist an das gleichzeitige Vorhandensein

von Chlorionen in der serosalen Lösung gebunden. Für diesen scheinbaren Widerspruch dürfte der Rest-Chloridgehalt der als „Cl<sup>-</sup>-frei“ bezeichneten Lösung infolge des Vorhandenseins von KCl und CaCl<sub>2</sub> sein. Dieser reichte offenbar aus, um den Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2 Cl<sup>-</sup>-Cotransporter zu betreiben und damit basolateral K<sup>+</sup> in die Zelle aufzunehmen.

Das deutlich schnellere Eintreten des Stromabfalls unter Cl<sup>-</sup>-freien Bedingungen weist darauf hin, daß auch die K<sup>+</sup>-Sekretion, die zur Absenkung des Isc führt, unmittelbar nach der Adrenalinapplikation stimuliert wurde, aber unter Standard-Bedingungen anfangs kurzfristig von einer größeren Cl<sup>-</sup>-Sekretion, die den Isc anhebt, überdeckt wurde.

Die Flüsse anderer Ionen als K<sup>+</sup> waren dagegen in der Spätphase der Adrenalin-Wirkung nur wenig verändert. Während der 2. Phase der Adrenalin-Antwort wurde der Anstieg der K<sup>+</sup>-Sekretion lediglich von einer Abnahme des sekretorischen wie auch des resorptiven Cl<sup>-</sup>-Flusses im distalen bzw. einer kleinen Steigerung des Serosa-nach-Mucosa-Flusses von Na<sup>+</sup> im proximalen Segment begleitet (Tab. 5). Adrenalin hat also nur marginale Effekte auf den Na<sup>+</sup>- und den Cl<sup>-</sup>-Transport durch das Colonepithel. Auch die spontane Bicarbonat-Sekretion blieb unverändert (Abb. III.8).

Die gemessenen Ionentransport-Änderungen können die nach Adrenalin gemessene Kurzschlußstrom-Änderung nicht vollständig erklären. Die Änderung im Netto-K<sup>+</sup>-Transport ist z. B. mit  $-0,11 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  im distalen Colon deutlich kleiner als der parallel gemessene Abfall des Isc von  $-0,5 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Möglicherweise finden also zusätzlich zu den oben beschriebenen weitere Veränderungen von Ionenflüssen statt: entweder so kleine Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>- bzw. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Flußänderungen, daß sie mit den eingesetzten Meßmethoden nicht erfaßbar sind und die sich aufsummieren, oder es sind die Transportverhältnisse

anderer als dieser gemessenen Ionen betroffen, obwohl dies unwahrscheinlich erscheint, da in den vorliegenden Versuchen die Bewegungen aller quantitativ bedeutsamen Ionensorten erfaßt wurden. Ein weiterer Aspekt mag hier eine Rolle spielen, der von Rechkemmer et al. (1996) bezüglich einer ähnlichen „unerklärlichen“ Isc-Änderung am distalen Meerschweinchen-Colon diskutiert wurde: Die mit Hilfe der Tracer-Technik gemessenen sekretorischen  $K^+$ -Flüsse sind falsch klein, wenn ein- und dieselbe Zelle sowohl an der  $K^+$ -Sekretion als auch an der  $K^+$ -Resorption beteiligt ist. Ist dies der Fall, wird zum einen der Tracer  $^{86}Rb^+$  von der markierten basolateralen Seite durch die Zelle nach mucosal transportiert. Zum anderen werden aber zugleich von apical unmarkierte  $K^+$ -Ionen in die Zelle aufgenommen. Dort vermischen sich von mucosal aufgenommenes wie auch intrazellulär schon vorhandenes  $K^+$  mit  $^{86}Rb^+$ , was eine Verdünnung der von serosal in die Zelle aufgenommenen Menge an Radioaktivität bewirkt. Dadurch werden über den apicalen  $K^+$ -Transportweg mehr Ionen sezerniert, als bei den Aktivitätsmessungen erfaßt werden können. Letzterer Erklärungsansatz dürfte in jedem Fall für das Zustandekommen dieser Diskrepanz zwischen dem  $\Delta I_{sc}$  und den gefundenen Ionenflußänderungen verantwortlich sein, ob allein oder neben einem oder beiden der davor genannten Punkte, muß offen bleiben.

Die Änderungen des Kurzschlußstroms nach Adrenalin sind am distalen wie am proximalen Colon sehr ähnlich; die Vermittlung dieses Effekts hingegen ist, abhängig vom Segment, deutlich verschieden.

Am distalen Segment wurde der kurze Isc-Anstieg durch den Cyclooxygenase-Inhibitor Indometacin unterdrückt (Abb. III.9). Dies läßt auf eine Zwischenschaltung endogener Prostaglandine schließen, die überwiegend im submucosalen Bindegewebe des Darms produziert werden (s. Craven und DeRubertis, 1986). Das Neurotoxin Tetrodotoxin verhinderte distal den Abfall

des Isc nach Adrenalin (Abb. III.10). Die  $K^+$ -Sekretion dieser Phase wird also durch sekretomotorische enterale Neurone vermittelt. Auf den ersten Blick widersprüchlich sind die Ergebnisse von Racusen und Binder (1979), bei denen TTX die Isc-Änderung nach Adrenalin am Ratten-Colon nicht beeinflusste. Doch hier wurde im Gegensatz zu den jetzigen Untersuchungen nicht zwischen proximalem und distalem Segment differenziert, was ein gänzlichliches Fehlen dieser Hemmung vortäuschte.

Proximal verursachte keiner der beiden Blocker eine Modifikation des Adrenalin-Effekts. Hier übt Adrenalin seine Wirkung direkt an den enteralen Epithelzellen aus.

Eine vergleichbare Kombination von indirekten, neuronal bzw. Prostaglandin-vermittelten wie auch direkten Wirkmechanismen ist früher schon bei der Auslösung einer  $Cl^-$ -Sekretion durch Bradykinin am Colon der Ratte gefunden worden (Diener et al., 1988).

Der nicotinische Rezeptor-Blocker Hexamethonium, wie TEA eine quartäre Ammoniumverbindung (Starke, 1996b), verringerte den Stromabfall distal. Demzufolge spielen bei der Weiterleitung der Wirkung von Adrenalin nicotinerge Rezeptoren eine Rolle. Wie das Fehlen eines Einflusses des Alkaloids der Tollkirsche, des Tropasäureesters Atropin (Starke, 1996b), auf die Adrenalin-Antwort zeigt, findet die Vermittlung des Effekts auf die Enterozyten am distalen Segment ohne Beteiligung von Acetylcholin statt. Eine Stimulation cholinergischer Neurone durch Adrenalin kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. In submucösen Ganglien des Meerschweinchen-Dünndarms z. B. enthalten ca. 75% der cholinergen Neurone weitere Substanzen als Cotransmitter: meist Substanz P, Neuropeptid Y, Somatostatin oder Cholezystokinin (Furness et al., 1984). Möglicherweise ist einer dieser nicht-cholinergen Transmitter in die Weiterleitung der Wirkung von Adrenalin

involviert. Proximal waren die Cholinozeptor-Blocker erwartungsgemäß unwirksam (Tab. 7).

Die Vermittlung des Adrenalin-Effekts erfolgt über unterschiedliche adrenerge Rezeptoren. Um diese genauer zu identifizieren, wurden Versuche mit verschiedenen nichtselektiven und selektiven Adrenozeptor-Blockern durchgeführt. Eingesetzt wurden folgende Substanzen: der nichtselektive  $\beta$ -Rezeptor-Blocker Propranolol, der ebenso wie der  $\beta_1$ -selektive Adrenozeptor-Blocker Atenolol zu den Phenoxypropanolamin-Derivaten zählt, daneben ICI 118551 als  $\beta_2$ -Rezeptor-Blocker (O'Donnell und Wanstall, 1980). Desweiteren das Imidazolin Phentolamin zur unselektiven  $\alpha$ -Blockade, das Indolalkaloid Yohimbin zur selektiven  $\alpha_2$ - und das Piperazinylquinazolin Prazosin zur  $\alpha_1$ -Blockade. Die Antagonisten verhindern die Fortleitung des Signals, indem sie den Einfluß des Rezeptors auf den jeweiligen nachfolgenden second messenger unterbinden. Dabei handelt es sich um  $\text{Ca}^{2+}$  im Falle des  $\alpha_1$ -Rezeptors bzw. um cAMP bei den übrigen drei Rezeptortypen (Hoffmann und Lefkowitz, 1990; Starke und Palm, 1996).

Der neuronal vermittelte Isc-Abfall im distalen Colon-Abschnitt wurde durch Zugabe des  $\beta$ -Blockers Propranolol wie auch des  $\beta_2$ -Blockers ICI 118551 gehemmt. Unter  $\beta_1$ -Rezeptor-Blockade mit Atenolol dagegen war die Stromabsenkung unverändert (Abb. III.11). Dies läßt auf eine Zwischenschaltung von  $\beta_2$ -Rezeptoren schließen, die sich entweder - was das einfachste Erklärungsmodell darstellt - direkt auf den vermittelnden Neuronen befinden, oder aber auf anderen Zellen, die ihrerseits die sekretomotorischen Neurone stimulieren. Die bei North und Surprenant (1985) beschriebene adrenerge, hemmende Beeinflussung von Neuronen des Plexus submucosus (hier durch Noradrenalin) wird zwar über  $\alpha_2$ -Rezeptoren übertragen. Dies schließt aber ersteren Erklärungsversuch nicht aus; auf anders lokalisierten Nervenzellen

wurden  $\beta$ -Rezeptoren schon gefunden (Starke, 1977). Über welchen Transmitter das Signal nach adrenerger Stimulation von den enteralen Neuronen weitergeleitet wird, ist noch nicht geklärt.

Am proximalen Segment unterdrückten der  $\alpha$ -Rezeptor-Blocker Phentolamin und der  $\alpha_2$ -Blocker Yohimbin die 2. Phase der Adrenalin-Antwort, nicht aber der  $\alpha_1$ -Blocker Prazosin (Abb. III.12). Also dürften hier  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren direkt auf den Epithelzellen die  $K^+$ -sekretorische Wirkung weiterleiten, vergleichbar dem TTX-insensitiven Isc-Abfall nach Adrenalin am Ileum des Kaninchens (Chang et al., 1982). Ein über  $\alpha_2$ -Rezeptoren direkt auf Enterozyten ausgeübter Effekt von Catecholaminen auf den Ionentransport am Darm wurde schon bei Burks (1994) beschrieben. Am Kaninchen-Colon hingegen sind  $\beta_1$ -Rezeptoren auf Epithelzellen für die Steigerung der  $K^+$ -Sekretion verantwortlich (Smith und McCabe, 1986).

Die Frage, aus welchem Grund die 1. Phase der Kurzschlußstrom-Änderung nach Adrenalin durch keine dieser Substanzen beeinflusst wurde, muß hier unbeantwortet bleiben. Möglicherweise findet hier eine Übermittlung des Effekts über  $\beta_3$ -Adrenozeptoren statt. Diese sog. „atypischen“  $\beta$ -Rezeptoren wurden bisher u. a. in Fettgewebe (Lefkowitz et al., 1990) und glatter Muskulatur des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen und sind gegenüber den konventionellen  $\beta$ -Rezeptor-Blockern insensitive (Burks, 1994).

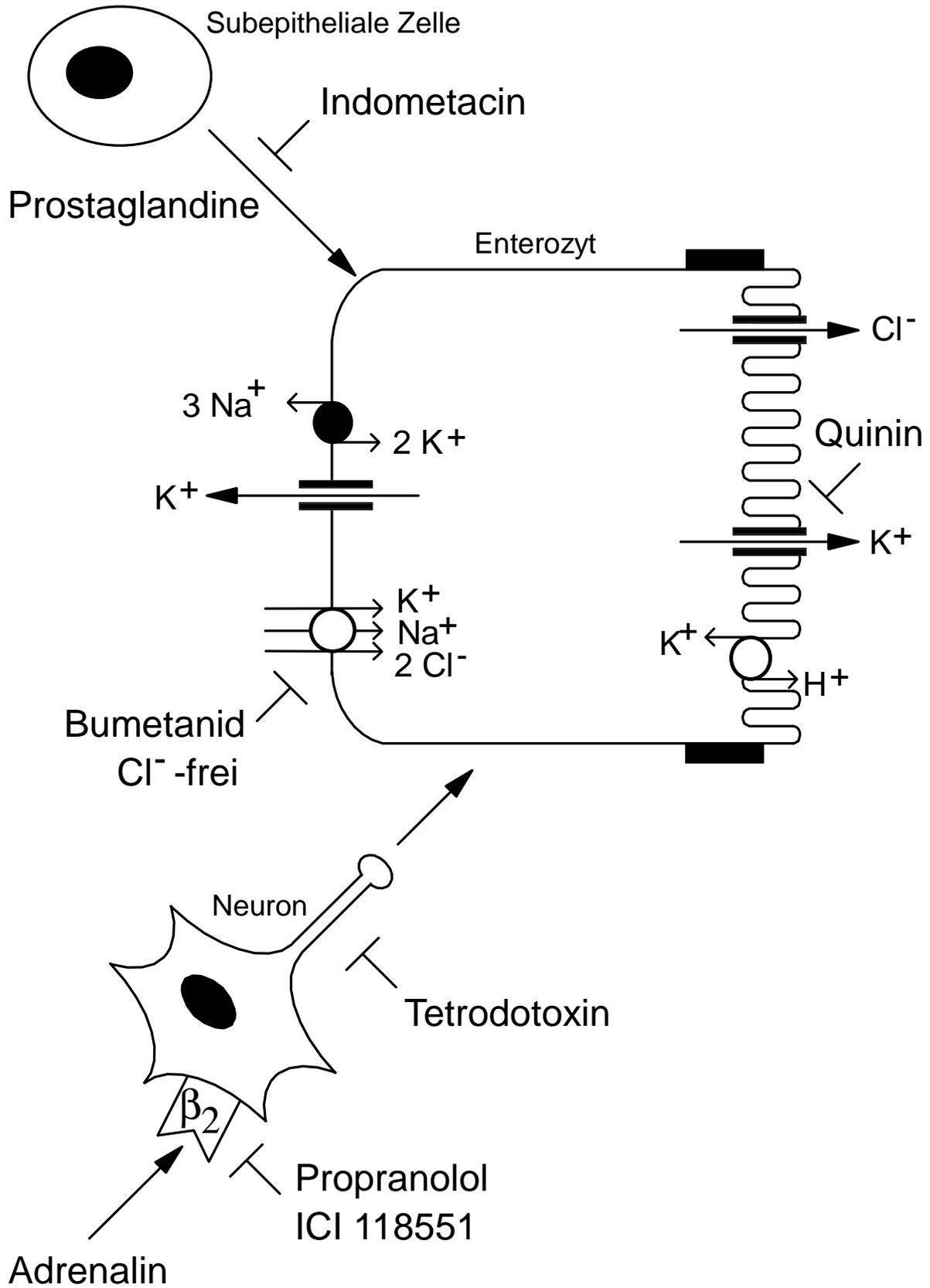
Weiterhin bleibt die Frage offen, welche intrazellulären Mediatoren bei der Weiterleitung der  $K^+$ -sekretorischen Wirkung von Adrenalin eine Rolle spielen. Am Rattencolon wurden als second messenger der  $K^+$ -Sekretion sowohl erhöhte cAMP-Konzentrationen (Foster et al., 1983; Diener et al., 1996) als auch erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen gefunden (Schult-heiß und Diener, 1997). Da für das distale Colon bisher Hinweise auf den Transmitter fehlen, der die Adrenalin-Wirkung auf die Epithelzellen

weiterleitet, ist hier noch kein Rückschluß auf die Beteiligung eines bestimmten second messenger möglich. Durch die Stimulation von  $\alpha_2$ -Rezeptoren wird entweder die Adenylatzyklase gehemmt und damit das cAMP-Level erniedrigt oder die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über einen Einstrom aus dem Extrazellulärraum, ähnlich wie durch  $\alpha_1$ -Rezeptoren, erhöht (Lefkowitz et al., 1990). Das macht es wahrscheinlicher, daß intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  der second messenger ist, der die Adrenalin-stimulierte  $\text{K}^+$ -Sekretion über  $\alpha_2$ -Rezeptoren am proximalen Colon der Ratte vermittelt.

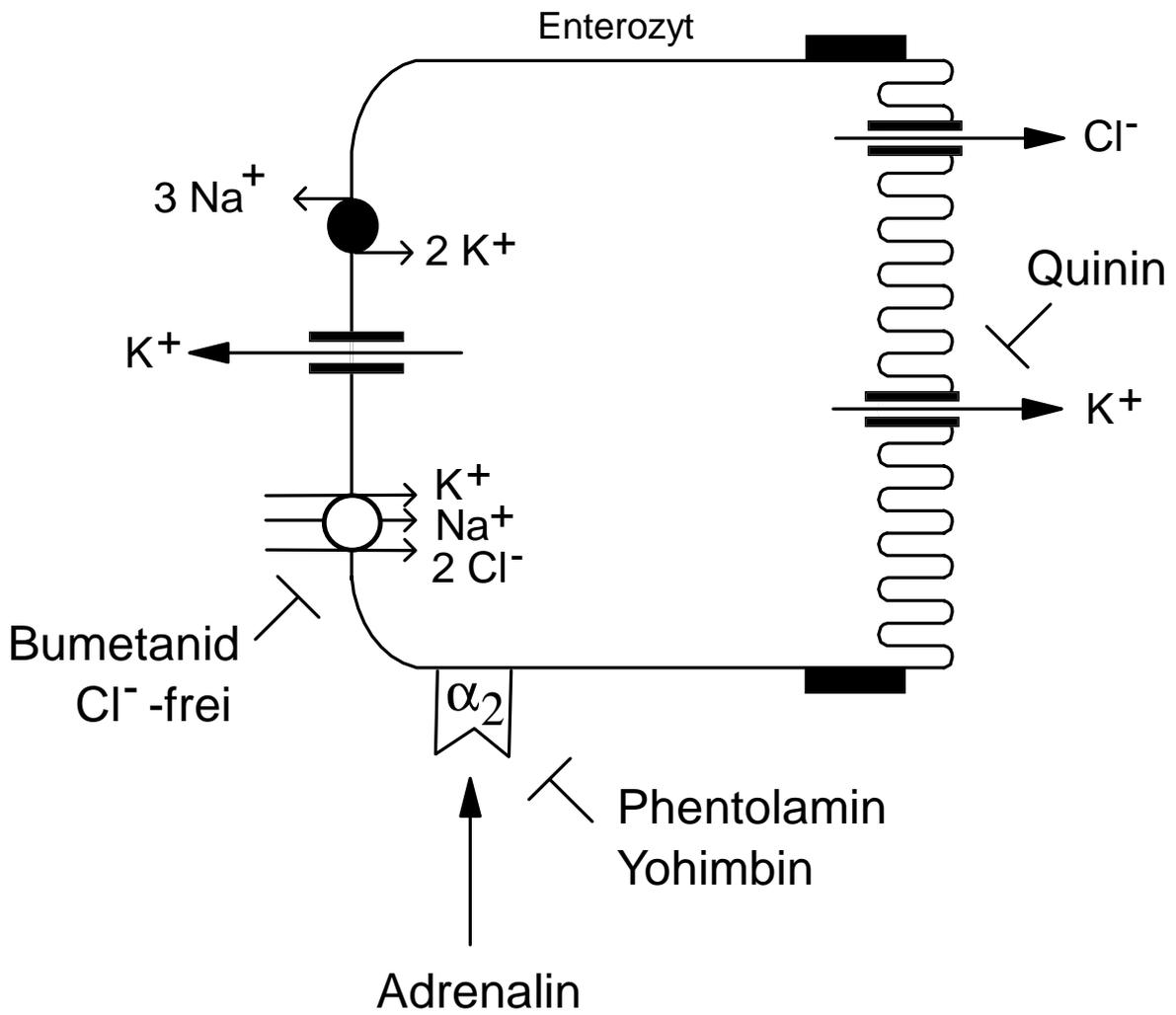
In welchem Maß Adrenalin die Transportfunktion des Colons in vivo unter physiologischen Bedingungen beeinflusst, ist fraglich. Im Plasma der Ratte wird in Ruhe eine Konzentration von  $1,0 \pm 0,16 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Adrenalin und  $3,0 \pm 0,27 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Noradrenalin gemessen, wobei sich die vom Nebennierenmark und die neuronal abgegebenen Mengen addieren (Döcke und Kemper, 1994). Physiologischer Streß kann die Adrenalin-Konzentration im Plasma auf 3 - 40  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  erhöhen. Unter im Versuch herbeigeführten, extremen Streßreizen können Plasma-Adrenalinspiegel von 200 - 300  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (am narkotisierten Tier) vorkommen (Szabo B., Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg, persönl. Korrespondenz, 1998). Die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzte Konzentration lag im einstelligen Mikromol-Bereich. Dies dürfte im lebenden Organismus, insbesondere unter nicht-experimentellen Umständen, kaum jemals erreicht werden.

Die Resultate der Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Adrenalin übt auf den Ionentransport im Rattencolon einen segmentabhängig unterschiedlichen Effekt aus. Es werden eine schnell abklingende Chloridsekretion und eine anhaltende Kaliumsekretion ausgelöst. Distal wird die erstgenannte Wirkung über subepithelial freigesetzte Prostaglandine weitergeleitet, die  $\text{K}^+$ -sekretorische Wirkung über  $\beta_2$ -Rezeptoren und sekreto-

motorische enterale Neurone. Proximal erfolgt die Wirkungsübermittlung via  $\alpha_2$ -Rezeptoren, die direkt auf den Enterozyten lokalisiert sind. Diese Wirkmechanismen sind abschließend in Abb. IV.A und B zur Veranschaulichung noch einmal schematisch dargestellt.



**Abb. IV.B:** Modell zur Wirkung von Adrenalin am distalen Colon.



**Abb. IV.A:** Modell zur Wirkung von Adrenalin am proximalen Colon.

## Zusammenfassung

Die Wirkungen von Adrenalin auf den Transport von  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  und  $HCO_3^-$  durch das Rattencolon wurden mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik untersucht. Adrenalin ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot l^{-1}$ ) rief eine zweiphasige Änderung des Kurzschluß-Stroms ( $I_{sc}$ ) im distalen und proximalen Colon hervor: einen kurzen, transienten Anstieg, gefolgt von einer langanhaltenden Absenkung. Die 1. Phase der  $I_{sc}$ -Antwort fehlte unter  $Cl^-$ -freien Bedingungen und nach Vorbehandlung mit Bumetanid, einem Blocker des  $Na^+ - K^+ - 2 Cl^-$ -Cotransporters. Dies deutet auf eine vorübergehende Stimulierung der  $Cl^-$ -Sekretion hin. Die 2. Phase des Adrenalin-Effekts wurde durch Zugabe des  $K^+$ -Kanal-Blockers Quinin unterdrückt und ging mit einem Anstieg des sekretorischen  $Rb^+$ -Flusses ( $J^{Rb}_{sm}$ ) einher. Diese war jedoch deutlich kleiner als die Änderung des  $I_{sc}$ . Daneben trat am distalen Colon nach Zusatz von Adrenalin eine Verminderung des resorptiven und des sekretorischen  $Cl^-$ -Flusses auf.

Im distalen Segment hemmte der Cyclooxygenase-Blocker Indometacin die 1. Phase der Antwort auf Adrenalin, während die 2. Phase durch das Neurotoxin Tetrodotoxin aufgehoben wurde. Proximal waren beide Substanzen ohne Wirkung. Der neuronal vermittelte Einfluß von Adrenalin wurde distal durch den nicht-selektiven  $\beta$ -Rezeptorblocker Propranolol und den  $\beta_2$ -selektiven Blocker ICI 118551 unterdrückt. Die Adrenalin-induzierte  $K^+$ -Sekretion am proximalen Abschnitt wurde hingegen durch den unselektiven  $\alpha$ -Blocker Phentolamin und den selektiven  $\alpha_2$ -Blocker Yohimbin gehemmt.

Diese Ergebnisse deuten auf eine segment-sepezifische Wirkung von Adrenalin auf den Ionentransport hin: auf einen indirekten Einfluß, vermittelt über sekretomotorische Neurone, via  $\beta_2$ -Rezeptoren am distalen und auf eine

direkte Stimulation der Epithelzellen über  $\alpha_2$ -Rezeptoren am proximalen Colon.

## Summary

The effect of epinephrine on transport of  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  and  $HCO_3^-$  across the colon of the rat was studied with the Ussing chamber technique. Epinephrine ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) induced a biphasic change in short-circuit current (Isc) in distal and proximal colon: a transient increase followed by a long-lasting decay. The first phase of the Isc response was abolished in  $Cl^-$ -poor solution or after administration of bumetanide, an inhibitor of the  $Na^+ \text{-} K^+ \text{-} 2 \text{ } Cl^-$  cotransporter, indicating a transient induction of  $Cl^-$  secretion. The 2. phase of the response to epinephrine was suppressed by administration of the  $K^+$  channel blocker, quinine, and was concomitant with an increase in  $J^{Rb}_{sm}$  indicating that epinephrine induced  $K^+$  secretion, although this response was much smaller than the change in Isc. In addition, the distal colon displayed a decrease in  $J^{Cl}_{ms}$  and  $J^{Cl}_{sm}$  when treated with epinephrine.

In the distal colon indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, abolished the 1. phase of the epinephrine effect, whereas the 2. phase was suppressed by tetrodotoxin. In the proximal colon indomethacin and tetrodotoxin were ineffective. The neuronally-mediated response to epinephrine in the distal colon was suppressed by the non-selective  $\beta$ -receptor blocker, propranolol, and by the  $\beta_2$ -selective blocker, ICI 118551, whereas the epithelial response in the proximal colon was suppressed by the non-selective  $\alpha$ -blocker, phentolamine, and by the selective  $\alpha_2$ -blocker, yohimbine.

These results indicate a segment-specific action of epinephrine on ion transport: an indirect action on secretomotor neurons via  $\beta_2$ -receptors in the distal and a direct stimulatory action on epithelial  $\alpha_2$ -receptors in the proximal colon.

## Literaturverzeichnis

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. **1995**  
Membrantransport kleiner Moleküle und Ionen als Grundlage der Membranerregbarkeit  
In: Molekularbiologie der Zelle  
Hrsg.: Jaenicke L., 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 599-650
- Andres H., Bock R., Bridges R. J., Rummel W., Schreiner J. **1985**  
Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa.  
Journal of Physiology 364: 301-312
- Beubler E., Juan H. **1978**  
PGE-release, blood flow and transmucosal water movement after mechanical stimulation of the rat jejunal mucosa  
Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology 305: 91-95
- Billroth T. **1858**  
Einige Beobachtungen über das ausgedehnte Vorkommen von Nervenastomosen im Tractus intestinalis.  
Archiv für Anatomie und Physiologie, 148-158
- Binder H.J., Sandle G.I. **1994**  
Electrolyte Transport in the Mammalian Colon  
In: Physiology of the Gastrointestinal Tract  
Hrsg.: Johnson L.R., 3. Auflage, Raven Press, New York, pp. 2133-2171
- Bridges R. J., Rack M., Rummel W., Schreiner J. **1986**  
Mucosal plexus and electrolyte transport across the rat colonic mucosa  
Journal of Physiology 376: 531-542
- Burks T.F. **1994**  
Neurotransmission and Neurotransmitters  
In: Physiology of the Gastrointestinal Tract  
Hrsg.: Johnson L.R., 3. Auflage, Raven Press, New York, pp. 211-242
- Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R. Jr., Trendelenburg U. **1994**  
International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors.  
Pharmacological Reviews 46: 121-136
- Cabantchik Z. I., Greger R. **1992**  
Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes.  
American Journal of Physiology 262: C803-27

Catterall W.A. **1980**

Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes.  
Annual Review of Pharmacology and Toxicology 20: 15-43

Catterall W.A. **1995**

Structure and function of voltage-gated ion channels.  
Annual Review of Biochemistry 64: 493-531

Chang E.B., Field M., Miller R. J. **1982**

alpha 2-Adrenergic receptor regulation of ion transport in rabbit ileum.  
American Journal of Physiology 242: G237-242

Chipperfield A.R. **1986**

The (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>) co-transport system.  
Clinical Science 71: 465-476

Cook N.S., Quast U. **1990**

Potassium channel pharmacology.  
In: Potassium channels. Structure, classification, function and therapeutic potential.  
Hrsg.: Cook N.S., Ellis Horwood Ltd., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, pp. 181-255

Craven P.A., DeRubertis F.R. **1986**

Profiles of eicosanoid production by superficial and proliferative colonic epithelial cells and sub-epithelial colonic tissue.  
Prostaglandins 32: 387-399

Curtis-Prior P.B. **1976**

Agents affecting prostaglandin metabolism.  
In: Prostaglandins. An Introduction to their Biochemistry, Physiology and Pharmacology.  
Hrsg.: Curtis-Prior P.B., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 41-54

Del Castillo J.R., Rajendran V.M., Binder H.J. **1991**

Apical membrane localization of ouabain-sensitive K-activated ATPase activities in rat distal colon.  
American Journal of Physiology 261: G1005-1011

Diener M., Bridges R.J., Knobloch S.F., Rummel W. **1988**

Indirect effects of bradykinin on ion transport in rat colon descendens: mediated by prostaglandins and enteric neurons.  
Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology 337: 69-73

Diener M., Hug F., Strabel D., Scharrer E. **1996**

Cyclic AMP-dependent regulation of K<sup>+</sup> transport in the rat distal colon.  
British Journal of Pharmacology 118: 1477-1487

Diener M., Mestres P., Bridges R.J., Rummel W. **1989**

Functional and morphological changes during electric field stimulation of rat colon descendens.

In.: Nerves and the Gastrointestinal Tract

Hrsg.: Singer M.v., Goebell H., MTP Press, Lancaster, Boston, The Hague, Dordrecht, pp. 705-712

Diener M., Nobles M., Rummel W. **1992**

Activation of basolateral Cl<sup>-</sup> channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease.

Pflügers Archiv European Journal of Physiology 421: 530-538

Döcke F., Kemper A. **1994**

Nebennierenmark

In: Veterinärmedizinische Endokrinologie

Hrsg.: Döcke F., 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, pp. 357-396

Dudel J. **1995a**

Informationsvermittlung durch elektrische Erregung

In: Physiologie des Menschen

Hrsg.: Schmidt R. F., Thews G., 26. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, pp. 20-42

Dudel J. **1995b**

Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle

In: Physiologie des Menschen

Hrsg.: Schmidt R. F., Thews G., 26. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, pp. 43-66

Fichtl B., Fülgraff G., Neumann H.-G., Wollenberg P., Forth W., Henschler D., Rummel W. **1996**

Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

Hrsg.: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K., 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 3-102

Field M., McColl I. **1973**

Ion transport in rabbit ileal mucosa. 3. Effects of catecholamines.

American Journal of Physiology 225: 852-857

Field M., Sheerin H.D., Henderson A., Smith P. L. **1975**

Catecholamine effects on cyclic AMP levels and ion secretion in rabbit ileal mucosa.

American Journal of Physiology 229: 86-92

Foster E.S., Hayslett J.P., Binder H.J. **1984**

Mechanism of active potassium absorption and secretion in the rat colon.

American Journal of Physiology 245: G611-617

- Foster E.S., Sandle G.I., Hayslett J.P., Binder H.J. **1983**  
 Cyclic adenosine monophosphate stimulates active potassium secretion in the rat colon.  
*Gastroenterology* 84: 324-330
- Frizzell R.A., Koch M.J., Schultz S.G. **1976**  
 Ion transport by rabbit colon. I. Active and passive components  
*Journal of Membrane Biology* 27: 297-316
- Fromm M., Hierholzer K. **1995**  
 Epithelien  
 In: *Physiologie des Menschen*  
 Hrsg.: Schmidt R. F., Thews G., 26. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, pp. 719-736
- Furness J.B., Costa M., Keast J.R., **1984**  
 Choline acetyltransferase- and peptide immunoreactivity of submucous neurons in the small intestine of the guinea-pig.  
*Cell and Tissue Research* 237: 329-336
- Halm D.R. **1984**  
 Neuromodulation of intestinal ion transport. Symposium summary  
*Federation Proceedings* 43(14): 2929-2934
- Hoffmann B.B., Lefkowitz R.J. **1990**  
 Adrenergic receptor antagonists.  
 In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*  
 Hrsg.: Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P., 8. Auflage, Pergamon Press, Inc., New York, Oxford, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 221-243
- Jänig W. **1995**  
 Vegetatives Nervensystem  
 In: *Physiologie des Menschen*  
 Hrsg.: Schmidt R. F., Thews G., 26. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, pp. 340-368
- Kaiser C., Rzeszotarski W.J. **1987**  
 Cholinergic agents.  
*Neurotransmission, Research Biochemicals Inc.* 3: 1-5
- Kashgarian M. **1980**  
 Changes in Cell Membrane Surfaces Associated with Alterations of Transepithelial Ion Movement  
 In: *Current Topics in Membranes and Transport*  
 Hrsg.: Boulpea E. L., Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, Band 13, pp. 149-160

Keast J.R., Furness J.B., Costa M. **1986**

Effects of noradrenaline and somatostatin on basal and stimulated mucosal ion transport in the guinea-pig small intestine.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 333: 393-399

Kenyon J.L., Gibbons W.R. **1977**

Effects of low-chloride solutions on action potentials of sheep cardiac purkinje fibers.

Journal of General Physiology 70: 635-660

Lefkowitz R.J., Hoffmann B.B., Taylor P. **1990**

Neurohumoral transmission: The autonomic and somatic motor nervous systems.

In: The Pharmacological Basis of Therapeutics

Hrsg.: Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P., 8. Auflage, Pergamon Press, Inc., New York, Oxford, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 94-121

Leonhardt H. **1985**

Verdauungsorgane

In: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen

Hrsg.: Leonhardt H., 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp. 369-409

Lindström C.G., Rosengren J.E., Fork F.T. **1979**

Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation.

Acta Radiologica Diagnosis Stockholm 20: 523-536.

Meyer H.H.D. **1994**

Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen

In: Veterinärmedizinische Endokrinologie

Hrsg.: Döcke F., 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, pp. 76-88

Nobles M., Diener M., Mestres P., Rummel W. **1991**

Segmental heterogeneity of the rat colon in the response to activators of secretion on the cAMP-, the cGMP- and the Ca<sup>2+</sup>-pathway.

Acta Physiologica Scandinavia 142: 375-386

North R.A., Surprenant A. **1985**

Inhibitory synaptic potentials resulting from alpha<sub>2</sub>-adrenoceptor activation in guinea-pig submucous plexus neurones.

Journal of Physiology London 358: 17-33

O'Donnell S.R., Wanstall J.C. **1980**

Evidence that ICI 118,551 is a potent, highly Beta 2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize Beta-adrenoceptor populations in tissues.

Life Sciences 27: 671-677

Olds R.J., Olds J.R. **1984**

Farbatlas der Anatomie der Ratte

Schober Verlags-GmbH, Hengersberg

- Parsons D.S., Paterson C.R. **1965**  
Fluid and solute transport across rat colonic mucosa.  
Quarterly Journal of Experimental Physiology 50: 220-231
- Powell D.W. **1981**  
Barrier function of epithelia.  
American Journal of Physiology 241: G275-288
- Racusen L.C., Binder H.J. **1979**  
Adrenergic interaction with ion transport across colonic mucosa: role of both alpha and beta adrenergic agonists.  
In: Mechanisms of Intestinal Secretion  
Hrsg.: Binder H.J., Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 201-215
- Rechkemmer G., Frizzell R.A., Halm D.R. **1996**  
Active potassium transport across guinea-pig distal colon: action of secretagogues.  
Journal of Physiology London 493: 485-502
- Ross E.M. **1990**  
Pharmacodynamics: mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect  
In: The Pharmacological Basis of Therapeutics  
Hrsg.: Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P., 8. Auflage, Pergamon Press, Inc., New York, Oxford, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, pp.33-48
- Sandle G.I., McGlone F. **1987**  
Segmental variability of membrane conductances in rat and human colonic epithelia. Implications for Na, K and Cl transport.  
Pflügers Archiv European Journal of Physiology 410: 173-180
- Sangan P., Rajendran V.M., Mann A.S., Kashgarian M., Binder H.J. **1997**  
Regulation of colonic H-K-ATPase in large intestine and kidney by dietary Na depletion and dietary K depletion.  
American Journal of Physiology 272: C685-696
- Schultheiß G., Diener M. **1997**  
Regulation of apical and basolateral K<sup>+</sup> conductances in rat colon.  
British Journal of Pharmacology 122: 87-94
- Schultheiß G., Hörger S., Diener M. **1998**  
The bumetanide-resistant part of forskolin-induced anion secretion in rat colon  
Acta Physiologica Scandinavica 164: 219-228
- Seamon K.B., Padgett W., Daly J.W. **1981**  
Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells.  
Proceedings of the National Academy of Science USA 78: 3363-3367

Smith P.L., McCabe R.D. **1986**

Potassium secretion by rabbit descending colon: effects of adrenergic stimuli  
American Journal of Physiology 250(4 Pt 1): G432-G439

Sobotta J., Becher H. **1972**

Verdauungsapparat

In: Atlas der Anatomie des Menschen

Hrsg.: Ferner H., Staubesand J., 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, Band 2, pp. 61-143

Starke K. **1977**

Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems.  
Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology 77: 1-124

Starke K. **1996a**

Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

Hrsg.: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K., 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 103-133

Starke K. **1996b**

Pharmakologie cholinergischer Systeme.

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

Hrsg.: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K., 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 135-159

Starke K., Palm D. **1996**

Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme.

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

Hrsg.: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K., 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 161-200

Stewart C. P., Winterhager J. M., Heintze K., Petersen K. U. **1989**

Electrogenic bicarbonate secretion by guinea pig gallbladder epithelium: apical membrane exit.

American Journal of Physiology 256: C736-49

Strabel D., Diener M. **1995**

The effect of neuropeptide Y on sodium, chloride and potassium transport across the rat distal colon.

British Journal of Pharmacology 115: 1071-1079

Surprenant A. **1992**

Neural control of submucosal vasculature

In: Advances in the innervation of gastrointestinal tract

Hrsg.: Halle G.E., Wood J.D., Elsevier Science Publishers BV, New York, pp. 455-464

Tapper E.J., Lewand D.L. **1981**

Actions of a nicotinic agonist, DMPP, on intestinal transport in vitro.  
Life Science 28: 155-162

Vaupel P., Ewe K. **1995**

Funktion des Magen-Darm-Kanals

In: Physiologie des Menschen

Hrsg.: Schmidt R. F., Thews G., 26. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, pp. 806-850

Winterhager J.M., Stewart C.O., Heintze K., Petersen K.U. **1986**

Electroneutral secretion of bicarbonate by guinea pig gallbladder epithelium.  
American Journal of Physiology 250: C617-C628

Wood J.D. **1994**

Physiology of the enteric nervous system

In: Physiology of the gastrointestinal tract

Hrsg. Johnson L.R., 3. Auflage, Raven Press, New York, pp. 423-482

## **Danksagung**

Dank an alle, die einen Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit geleistet haben:

an erster Stelle an Prof. Dr. Martin Diener für die Überlassung des Themas, die unermüdliche Beantwortung aller Fachfragen und die intensive und freundliche Betreuung bei der Versuchsdurchführung und der Erstellung dieser Dissertation,

an Dr. Gerhard Schultheiß, Dr. Bernhard Heinke und TA Guido Haschke für die Hilfestellung im Umgang mit der Versuchstechnik und mit dem Computer,

an Alice Metternich, Eva Haas, Bärbel Schmidt und Brigitta Brück für die Einweisung in die Handhabung der Laborgeräte und die sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente,

an Karen, meine buchstabengenaue Korrekturleserin,

meiner Familie und allen, die mich während Studium und Promotion unterstützt haben - ganz besonders sei hier der Name Muscheid hervorgehoben -

und last, but not least den Ratten, die für diese Forschungsarbeit ihr Leben ließen.