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 $3{,}4 \pm 0{,}1\ \mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$ 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_2, $F_{2\alpha}$ oder I_2, 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^+-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 ($5 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot l^{-1}$) 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 β-Rezeptor-Stimulierung ist eine Abnahme der Kapazität zur cAMP-Synthese bekannt, bei α-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 Ionentransportverhältnissen 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^--Sekretion zurückzuführen. Dies ergaben Versuche unter Cl^--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^+-K^+-2 Cl^--Cotransporter (Cabantchik und Gereger, 1992), der in der basolateralen Membran der Colonepithelzellen lokalisiert und maßgeblich am Ablauf eines sekretorischen Cl^--Transports der Zelle beteiligt ist (Abb. III.5; Chipperfield, 1986).

Die 2. Phase des Adrenalin-Effekts auf den Isc ist auf eine K^+-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^+-Kanäle (Cook und Quast, 1990). Zudem ging diese Phase mit einer Steigerung der Serosa-nach-Mucosa-Flüsse des Markers $^{86}Rb^+$ einher (Abb. III.6, Tab. 7). Sie ist somit auf eine K^+-Sekretion via apikalen, Quinin-sensitiven K^+-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^--freiem Puffer (Abb. III.4 und III.5). Für die volle Aufrechterhaltung der K^+-Sekretion ist die Aufnahme dieses Ions von basolateral über den Na^+-K^+-2 Cl^--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^--frei“ bezeichneten Lösung infolge des Vorhandenseins von KCl und $CaCl_2$ sein. Dieser reichte offenbar aus, um den Na^+-K^+-2 Cl^--Cotransporter zu betreiben und damit basolateral K^+ in die Zelle aufzunehmen.

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

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

Die gemessenen Ionentransport-Änderungen können die nach Adrenalin gemessene Kurzschlußstrom-Änderung nicht vollständig erklären. Die Änderung im Netto-K^+-Transport ist z. B. mit -0,11 $\mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$ im distalen Colon deutlich kleiner als der parallel gemessene Abfall des Isc von -0,5 $\mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$. Möglicherweise finden also zusätzlich zu den oben beschriebenen weitere Veränderungen von Ionenflüssen statt: entweder so kleine Na^+, Cl^-- bzw. HCO_3^--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 vorliegegenden 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 ΔIsc 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 beein-flußte. Doch hier wurde im Gegensatz zu den jetzigen Untersuchungen nicht zwischen proximalem und distalem Segment differenziert, was ein gänzliches 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 cholinerger 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 β-Rezeptor-Blocker Propranolol, der ebenso wie der β_1-selektive Adrenozeptor-Blocker Atenolol zu den Phenoxypropanolamin-Derivaten zählt, daneben ICI 118551 als β_2-Rezeptor-Blocker (O´Donnell und Wanstall, 1980). Desweiteren das Imidazolin Phentolamin zur unselektiven α-Blockade, das Indolalkaloid Yohimbin zur selektiven α_2- und das Piperazinylquinazolin Prazosin zur α_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 Ca^{2+} im Falle des α_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 β-Blockers Propranolol wie auch des β_2-Blockers ICI 118551 gehemmt. Unter β_1-Rezeptor-Blockade mit Atenolol dagegen war die Stromabsenkung unverändert (Abb. III.11). Dies läßt auf eine Zwischenschaltung von β_2-Rezeptoren schließen, die sich entweder - was das einfachste Erklärungsmodell darstellt - direkt auf den vermittelnden Neuronen befinden, oder aber auf anderen Zellen, die ihrereseits 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 α_2-Rezeptoren übertragen. Dies schließt aber ersteren Erklärungsversuch nicht aus; auf anders lokalisierten Nervenzellen wurden β-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 α-Rezeptor-Blocker Phentolamin und der α_2-Blocker Yohimbin die 2. Phase der Adrenalin-Antwort, nicht aber der α_1-Blocker Prazosin (Abb. III.12). Also dürften hier α_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 α_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 β_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 β_3-Adrenozeptoren statt. Diese sog. „atypischen" β-Rezeptoren wurden bisher u. a. in Fettgewebe (Lefkowitz et al., 1990) und glatter Muskulatur des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen und sind gegenüber den konventionellen β-Rezeptor-Blockern insensitiv (Burks, 1994).

Weiterhin bleibt die Frage offen, welche intrazellulären Mediatoren bei der Weiterleitung der K^+-sekretorischen Wirkung von Adrenalin ein 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 α_2-Rezeptoren wird entweder die Adenylatzyklase gehemmt und damit das cAMP-Level erniedrigt oder die Ca^{2+}-Konzentration über einen Einstrom aus dem Extrazellulärraum, ähnlich wie durch α_1-Rezeptoren, erhöht (Lefkowitz et al., 1990). Das macht es wahrscheinlicher, daß intrazelluläres Ca^{2+} der second messenger ist, der die Adrenalin-stimulierte K^+-Sekretion über α_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 ± 0,16 $nmol \cdot l^{-1}$ Adrenalin und 3.0 ± 0,27 $nmol \cdot l^{-1}$ 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 $nmol \cdot l^{-1}$ erhöhen. Unter im Versuch herbeigeführten, extremen Streßreizen können Plasma-Adrenalinspiegel von 200 - 300 $nmol \cdot l^{-1}$ (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 K^+-sekretorische Wirkung über β_2-Rezeptoren und sekretomotorische enterale Neurone. Proximal erfolgt die Wirkungsübermittlung via α_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.

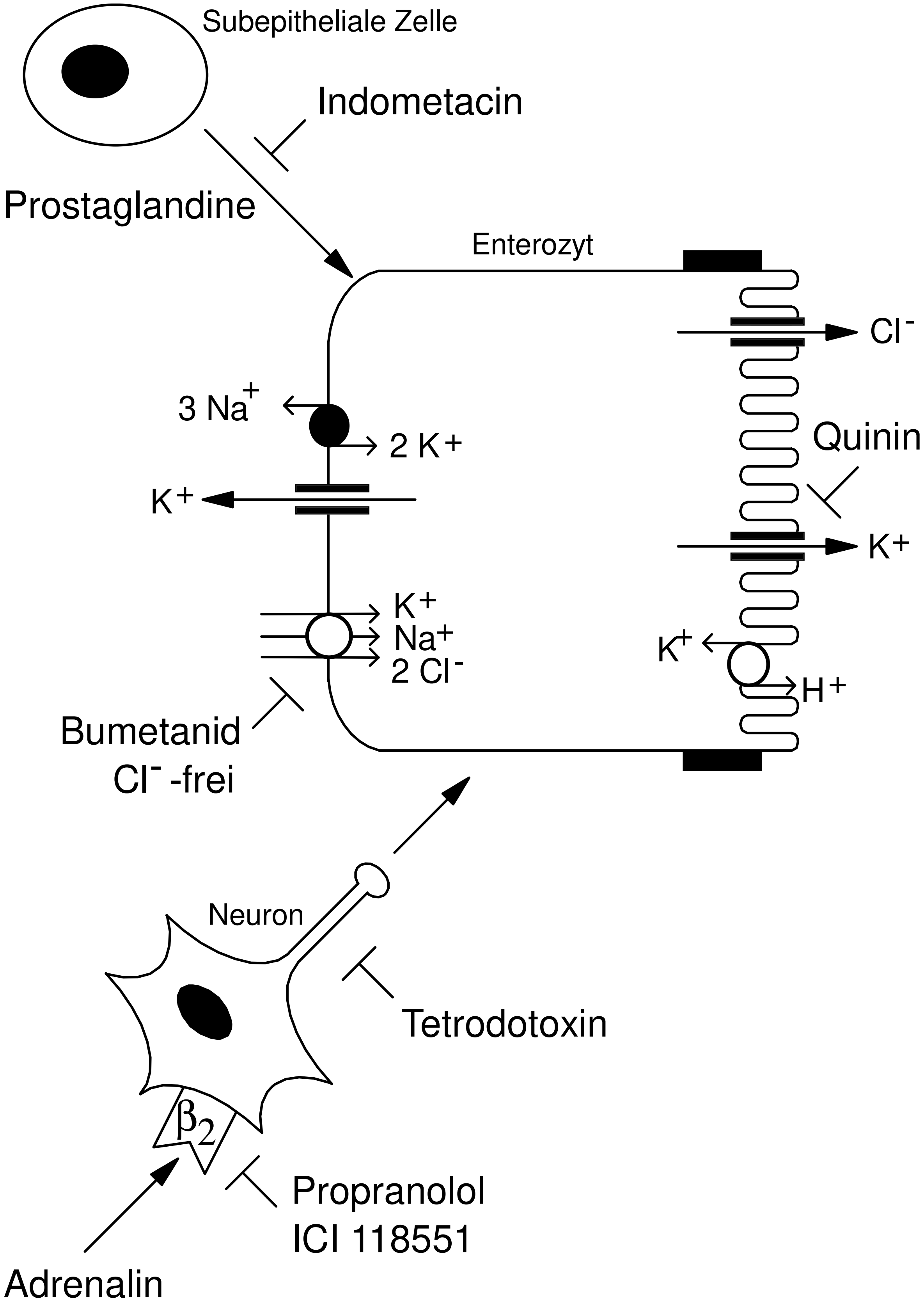

Abb. IV.B: Modell zur Wirkung von Adrenalin am distalen Colon.

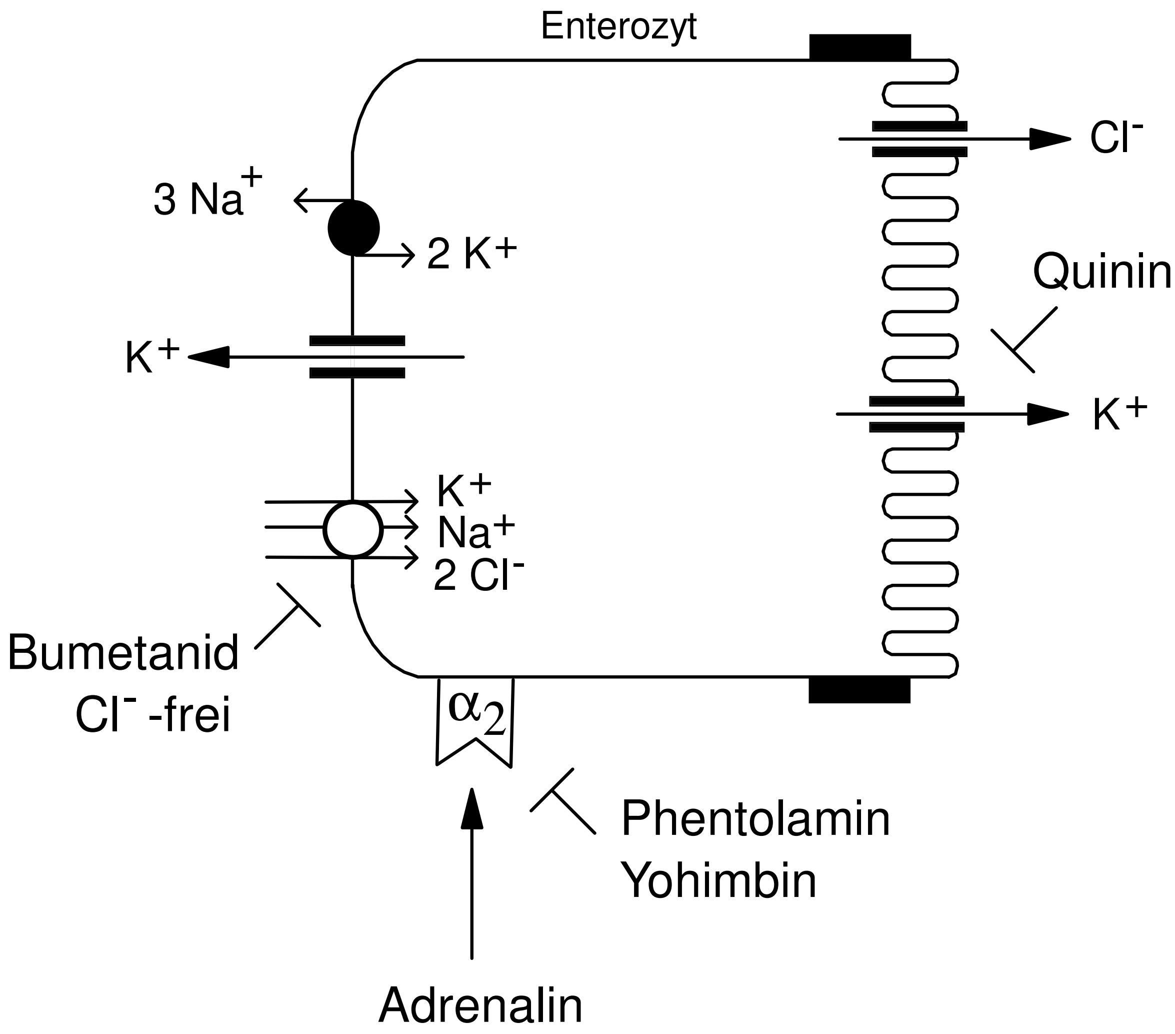

Abb. IV.A: Modell zur Wirkung von Adrenalin am proximalen Colon.