

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war, funktionell identifizierte Nervenzellpopulationen im myenterischen Plexus des Magenfundus anhand ihrer Projektionen und ihres neurochemischen Kodes zu charakterisieren. Die Identifizierung von Neuronen, welche zur Mukosa bzw. zum Zirkulärmuskel projizierten erfolgte durch retrograde Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil in Kombination mit einer Gewebekultur. Der neurochemische Kode der Dil markierten Neurone wurde durch immunhistochemische Anfärbungen folgender Neurotransmitter und neuronaler Marker bestimmt: Cholinazetyl-Transferase (ChAT), Stickoxid Synthase (NOS), Neuropeptid Y (NPY), Substanz P (SP), Enkephalin (ENK), Calretinin (CALRET), Somatostatin (SOM) und Gastrin Releasing Peptide (GRP). Alle Dil markierten Nervenzellen waren entweder immunreaktiv für ChAT (cholinerg) oder für NOS (nitroerg), wobei für beide Zielgewebe eine deutliche cholinerge Dominanz (Mukosa: 78% der Dil markierten Neurone; Muskel: 65% der Dil markierten Neurone) festgestellt wurde. Cholinerge Mukosa- und Muskelneurone projizierten primär in aufsteigende Richtung, während nitroerge Mukosa- und Muskelneurone eine absteigende Projektionspräferenz aufwiesen. Durch Kombinationsfärbungen gegen oben genannte Antigene konnten folgende neurochemischen Subpopulationen identifiziert werden, die in unterschiedlichem Ausmaß an der Innervation von Mukosa und Zirkulärmuskel beteiligt waren: ChAT/±GRP (Mukosaneurone: 32%, Muskelneurone: 14%); ChAT/NPY/±GRP (Mukosaneurone: 34%, Muskelneurone: 6%); ChAT/SP/±ENK/±GRP (Mukosaneurone: 9%, Muskelneurone: 28%); ChAT/ENK/±GRP (Mukosaneurone: 4%, Muskelneurone: 17%); NOS/- (Mukosaneurone: 4%, Muskelneurone: 10%); NOS/NPY/(GRP) (Mukosaneurone: 11%, Muskelneurone: 17%); NOS/NPY/ENK/(GRP) (Mukosaneurone: 1%, Muskelneurone: 9%). Der Kode ChAT/±GRP oder ChAT/NPY/±GRP war somit spezifisch für Mukosaneurone und der Kode ChAT/SP/±ENK/±GRP, ChAT/ENK/±GRP oder NOS/NPY/(GRP) spezifisch für Muskelneurone. Weder Calretinin- noch Somatostatin Immunreaktivität konnte in Mukosa- oder Muskelneuronen nachgewiesen werden.

Der Zirkulärmuskel des Magens wird durch aufsteigende exzitatorische und absteigende inhibitorische Projektionen innerviert. *In vitro* Mobilitätsmessungen an isolierten Funduspräparaten ergaben polarisierte Antworten während elektrischer Stimulation der Nervenzellen, die häufig eine cholinerg vermittelte kontraktile Komponente oral des Stimulus und eine nitroerg vermittelte hemmende Komponente anal des Stimulus enthielten.

Für die Innervation der Mukosa konnte keine so deutliche Projektionspolarität wie für die Muskelneurone nachgewiesen werden. Absteigende Projektionen waren hier zu gleichen Teilen cholinerg und nitroerg. Aufsteigende Projektionen waren ähnlich wie für den Muskel primär cholinerg.

In analogen *in vitro* Versuchen wurde die Sekretionsleistung der Fundusmukosa untersucht. An diese Präparate konnte zwar eine basale Säuresekretion gemessen werden, jedoch konnte eine zusätzliche Säuresekretion durch nervale Stimulation nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen der Mukosa-Integrität nach Versuchsende konnten zeigen, daß es nicht möglich ist, die Funktionalität der Magenmukosa über einen längeren Zeitraum *in vitro* aufrechtzuerhalten.

Motoneurone im Magen, insbesondere cholinerge Motoneurone wiesen einen zielgewebsspezifischen neurochemischen Kode auf. NPY scheint ein spezifischer Marker für Mukosaneurone zu sein, während SP und ENK spezifische Marker für Muskelneurone waren. Diese Studie zeigte erstmals Zusammenhänge zwischen dem Zielgewebe, dem neurochemischen Kode und den Projektionspräferenzen myenterischer Neurone im Magenfundus. Damit sind grundsätzliche Voraussetzungen für das Verständnis von intrinsischen neuralen Regulationsmechanismen im Magen etabliert worden

## 6. Summary

Pfannkuche, Helga (1999):

Identification and characterisation of myenteric neurones innervating mucosa or circular muscle of guinea-pig gastric fundus

The aim of this study was to characterise the projections and neurochemical coding of functional identified myenteric neurones in the fundic stomach. A combination of retrograde tracing with the fluorescent dye Dil and organotypic culture was applied to identify neurones projecting to the mucosa or the circular muscle. The neurochemical code of Dil-labelled neurones was established by immunohistochemical detection of the following neurotransmitters and neuronal markers : choline acetyltransferase (ChAT), nitric oxide synthase (NOS), neuropeptide Y (NPY), substance P (SP), enkephalin (ENK), calretinin (CALRET), somatostatin (SOM) and gastrin releasing peptide (GRP). All Dil-labelled neurones were either immunoreactive for ChAT or for NOS. For both targets the majority of Dil-labelled neurones was immunoreactive for ChAT (cholinergic) (mucosa: 78% of Dil-labelled neurones; circular muscle: 65% of Dil-labelled neurones) and not for NOS (nitergic). Cholinergic neurones had an ascending and nitergic neurones a descending projection preference. Multiple labelling with different combinations of antisera revealed that subpopulations innervating mucosa or circular muscle have distinct neurochemical coding: ChAT/ $\pm$ GRP (mucosa-neurones: 32%, muscle-neurones:14%); ChAT/NPY/ $\pm$ GRP (mucosa-neurones: 34%, muscle-neurones: 6%); ChAT/SP/ $\pm$ ENK/ $\pm$ GRP (mucosa-neurones: 9%, muscle-neurones: 28%); ChAT/ENK/ $\pm$ GRP (mucosa-neurones: 4%, muscle-neurones: 17%); NOS/- (mucosa-neurones: 4%, muscle-neurones:10%); NOS/NPY/(GRP) (mucosa-neurones:11%, muscle-neurones: 17%); NOS/NPY/ENK/(GRP) (mucosa-neurones: 1%, muscle-neurones: 9%). The neurochemical code ChAT/ $\pm$ GRP or ChAT/NPY/ $\pm$ GRP was quite specific for mucosa-neurones, whereas muscle-neurones expressed mainly the code

CHAT/SP/ $\pm$ ENK/ $\pm$ GRP, CHAT/ENK/ $\pm$ GRP or NOS/NPY/(GRP). Almost none of the mucosa- or muscle-neurons contained CALRET or SOM.

The circular muscle of the stomach seems to be innervated by ascending excitatory and descending inhibitory pathways. Electrical stimulation of nerves revealed polarised muscle responses in isolated fundus preparations. Most responses consisted of a cholinergic mediated contraction oral to and a nitrgic mediated relaxation anal to the site of stimulation. Although the ascending pathways to the mucosa were dominated by cholinergic neurons, the descending pathways equally consisted of nitrgic and cholinergic neurons. Thus, clearcut polarised projections, comparable to those found for the innervation of the circular muscle, do not exist for the innervation of the fundic mucosa.

Using a similar approach experiments to measure acid secretion of fundic mucosa were performed. In these preparations a basal acid output could be detected, but neuronal stimulation did not result in any additional acid secretion. However, data on mucosal integrity obtained directly after the experiments indicated that the mucosa cells showed signs of severe damage. It seem therefore impossible to maintain functionality of gastric mucosa *in vitro* over a long period.

Motor neurons in the stomach, in particular cholinergic motor neurons have a distinct target specific coding; thus, NPY appears to be a good marker for mucosa-neurons, whereas SP and ENK are specific markers for muscle-neurons.

This study showed correlations between target tissue, neurochemical coding and projection preferences of myenteric neurons in the gastric fundus. The knowledge of such correlations is crucial to advance our understanding of intrinsic neural pathways regulating motility and secretion in the stomach.