

**Nachweis serotoninpositiver Mastzellen und
der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT₃
in cervicalen sympathischen Ganglien der Ratte.
Eine immunhistologische, morphometrische Studie.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Christian Frischholz
aus Gießen

Gießen 2005

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Gf. Direktor: Prof. Dr. Kummer

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Altmannsberger

Tag der Disputation: 28.11.2005

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ziele und Fragestellung	1
1.2 Die sympathischen Ganglien „Ganglion cervicale superius“ und „Ganglion stellatum“	3
1.2.1 Epineurium	3
1.2.2 Perineurium	3
1.2.3 Endoneurium	4
1.2.4 Satellitenzellen	5
1.2.5 Neurone	5
1.2.6 Synapsen	6
1.2.7 Gefäße	6
1.2.8 SIF-Zellen	7
1.2.9 Verschaltung und Projektionen	7
1.3 Schrankenstrukturen und Energieversorgung des Nervensystems	8
1.3.1 Die Blut-Hirn-Schranke und die Energieversorgung des ZNS	8
1.3.2 Die Blut-Nerven-Schranke und die Energieversorgung des peripheren Nerven	9
1.4 Die Mastzelle	10
1.4.1 Entwicklung	10
1.4.2 Morphologie	11
1.4.3 Vorkommen und Verteilung	11
1.4.4 Mediatoren und Inhaltsstoffe der Mastzelle	13
1.4.5 Vorkommen und Produktion von IgE	14
1.4.6 Fc-Rezeptoren für IgE	15
1.4.7 Aktivierung und Stabilisierung der Mastzelle	16
1.4.8 Degranulation der Mastzelle	17
1.4.9 Überempfindlichkeitsreaktionen und Allergie	18
1.4.10 Markierung und Identifizierung der Mastzelle	19
1.5 Morphologische und funktionelle Beziehung der Mastzelle zum Nervensystem	19
1.5.1 Das Vorkommen der Mastzelle im zentralen Nervensystem	19
1.5.2 Das Vorkommen der Mastzelle im peripheren Nervensystem	20
1.6 Serotonin und das serotonerge System	21
1.6.1 Synthese und Abbau von Serotonin	21
1.6.2 Vorkommen von Serotonin und Serotoninrezeptoren	22
1.6.3 Serotonin und Serotoninrezeptoren des peripheren Nerven	24
1.6.4 Serotoninrezeptoren des Sympathikus	25
1.7 Histamin und das histaminerge System	25
1.7.1 Synthese und Abbau von Histamin	25
1.7.2 Das Vorkommen von Histamin im Organismus	26
1.7.3 Histamin und Histaminrezeptoren	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Tiere	27
2.1.2 Geräte	27
2.1.3 Primärreagenzien	28
2.1.4 Sekundärreagenzien	29

2.1.5 Kontrollpeptide.....	30
2.1.6 Sonstige Reagenzien.....	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Gewebe.....	30
2.2.1.1 Gewebebegewinnung	30
2.2.1.2 Behandlung des Gewebes	30
2.2.1.3 Herstellen der Gewebeschnitte.....	31
2.2.2 Immunfluoreszenz	31
2.2.2.1 Aufbau der Versuchsreihe A	31
2.2.2.2 Aufbau der Versuchsreihe B.....	32
2.2.2.3 Allgemeine Versuchsvorbereitung.....	33
2.2.2.4 Ausführung der Doppelimmunfluoreszenz der Versuchsreihe A.....	33
2.2.2.5 Ausführung der Doppelimmunfluoreszenz der Versuchsreihe B.....	34
2.2.3 Kontrolle	34
2.2.3.1 Positivkontrolle.....	34
2.2.3.2 Negativkontrolle	34
2.2.4 Mikroskopische Dokumentation	35
2.2.4.1 Verwendete Filterkombinationen	35
2.2.4.2 Aufnahme der Präparate der Versuchsreihe A	35
2.2.4.3 Aufnahme der Präparate der Versuchsreihe B	36
2.2.4.4 Montage eines Referenzmaßstabs	37
2.2.5 Auswertung.....	37
2.2.5.1 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von Serotonin und GluT-1.....	37
2.2.5.2 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von Serotonin und RECA-1	39
2.2.5.3 Auszählung der Mastzellen.....	41
2.2.5.4 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von 5-HT ₃ -Rezeptor und VAcHT bzw. von 5-HT ₃ -Rezeptor und Synaptophysin	41
2.2.5.5 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von 5-HT ₃ -Rezeptor und PGP 9.5	43
2.2.5.6 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von 5-HT _{2A} -Rezeptor und RECA-1	46
2.2.6 Statistische Testverfahren.....	47
2.2.7 Rezepturen der verwendeten Lösungen	47
2.2.7.1 Chromgelatinierte Objektträger.....	47
2.2.7.2 Phosphatpuffer, 0,2 M	47
2.2.7.3 Vorspüllösung nach Forssmann et al. [1977]	48
2.2.7.4 Fixationslösung nach Zamboni et al. [1967].....	48
2.2.7.5 PBS (phosphate-buffered saline) und PBS mit doppeltem Salzgehalt	48
2.2.7.6 Präinkubationslösung	48
2.2.7.7 Carbonatgepufferte Glycerollösung.....	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Befunde der Versuchsreihe A.....	49
3.1.1 Darstellung von Serotonin	49
3.1.2 Darstellung des GluT-1.....	50
3.1.3 Darstellung von RECA-1.....	50
3.1.4 Doppelmarkierung von Serotonin und GluT-1.....	51
3.1.5 Doppelmarkierung von Serotonin und RECA-1	53
3.1.6 Doppelmarkierung von GluT-1 und RECA-1.....	53
3.2 Ergebnisse der quantitativen Auswertung: Versuchsreihe A	55
3.2.1 Mastzelle und Perineurium	55
3.2.2 Mastzelle und GluT-1-positives Gefäß	57
3.2.3 Mastzelle und RECA-1-positives Gefäß	58
3.2.4 Verteilung der Mastzellen über die longitudinale Ganglienachse.....	63
3.3 Befunde der Versuchsreihe B.....	65
3.3.1 Darstellung des Serotoninrezeptors vom Typ 5-HT ₃	65

3.3.2 Darstellung des Serotoninrezeptors vom Typ 5-HT _{2A}	66
3.3.3 Doppelmarkierung des 5-HT ₃ -Rezeptors und VAcHT bzw. des 5-HT ₃ -Rezeptors und Synaptophysin.....	67
3.3.4 Doppelmarkierung des 5-HT ₃ -Rezeptors und PGP 9.5	69
3.3.5 Doppelmarkierung von 5-HT ₃ -Rezeptor und Vimentin.....	71
3.3.6 Doppelmarkierung von 5-HT _{2A} -Rezeptor und RECA-1.....	72
3.4 Ergebnisse der elektronischen Bildanalyse: Versuchsreihe B	75
3.4.1 Doppelmarkierung des 5-HT ₃ -Rezeptors und VAcHT bzw. des 5-HT ₃ -Rezeptors und Synaptophysin.....	75
3.4.2 Doppelmarkierung des 5-HT ₃ -Rezeptors und PGP 9.5	80
3.5 Ergebnisse der manuellen Bildauswertung der Versuchsreihe B: Doppelmarkierung von 5-HT_{2A}-Rezeptor und RECA-1.....	84
4. Diskussion	88
4.1 Darstellung der serotoninhaltigen Mastzelle	88
4.2 Topographische Beziehung zwischen Mastzelle und Perineurium	89
4.3 Topographische Beziehung zwischen Mastzelle und postkapillären Venulen.....	90
4.4 5-HT _{2A} -Rezeptor an postkapillären Venulen	91
4.5 5-HT ₃ -Rezeptor an Neuronen und Satellitenzellen, nicht jedoch an cholinergen Synapsen.....	92
4.6 Aktivierung der Mastzelle in sympathischen Ganglien.....	95
4.6.1 Immunologische Aktivierung.....	95
4.6.2 Neuropeptiderge Aktivierung.....	96
4.6.2.1 Funktionelle Beziehung der Mastzelle zum Nervensystem.....	96
4.6.2.2 Neurogene Entzündung.....	97
4.6.2.3 SP und CGRP in sympathischen Ganglien und viszeromotorischen Neuronen	99
4.6.3 Regulation der Mastzellaktivität	101
4.7 Die Mastzelle erregt serotonerg das sympathische Neuron	102
4.8 Die Mastzelle als Modulator neuronaler Aktivität	104
4.8.1 Neuronale Langzeitpotenzierung	104
4.8.2 Antigen-induzierte Langzeitpotenzierung	107
4.9. Die Mastzelle als Regulator der Blut-Ganglien-Schranke.....	110
5. Zusammenfassung	114
6. Summary	116
7. Veröffentlichungen zum Thema.....	118
8. Literaturverzeichnis.....	119
9. Anhang	132
10. Danksagung	141
11. Erklärung	141
12. Lebenslauf	142

1 Einleitung

1.1 Ziele und Fragestellung

Es ist seit längerem bekannt, dass immunkompetente Zellen in Teilen des Nervensystems vorkommen. In verschiedenen Arbeiten [Weinreich und Udem 1987; Udem et al. 1990; Weinreich et al. 1995; Cavalcante de Albuquerque et al. 1996; Albuquerque et al. 1997] wird über das Vorkommen der Mastzelle in sympathischen Ganglien berichtet. Sowohl über ihre intraganglionäre Verteilung als auch über die Zielstrukturen und genauen Wirkungsmechanismen ihrer Mediatoren in den sympathischen Ganglien herrscht Unklarheit, obwohl diese für die Balance des autonomen Nervensystems essenzielle Zentren darstellen und somit die Homöostase des Organismus maßgeblich aufrechterhalten.

Hierbei nehmen die Mastzellen der Rodentia eine Sonderstellung ein, da ausschließlich sie als biogenes Amin zusätzlich Serotonin enthalten. Das Vorkommen der Serotoninrezeptoren der Typen 2A und 3 (5-HT_{2A}- und 5-HT₃-Rezeptoren) im Ganglion cervicale superius ist zwar prinzipiell bekannt, nicht jedoch ihre zelluläre Lokalisation in den sympathischen Ganglien. Über die Wirkung des Serotonins auf das Ganglion cervicale superius von Mammalia wurde bereits vor über 45 Jahren berichtet [Trendelenburg 1956]. Serotonin kann neuromodulatorisch bzw. als Neurotransmitter wirken. Es existieren physiologische Untersuchungen über die mastzellvermittelte, sog. „Antigen-induzierte-Langzeitpotenzierung“ (A-LTP, antigen-induced long-term potentiation) neuronaler Aktivität in sympathischen Ganglien [Weinreich und Udem 1987; Udem et al. 1990; Cavalcante de Albuquerque et al. 1996; Albuquerque et al. 1997] sowie über die für die Induktions- und Aufrechterhaltungsphase der tetanisch induzierten LTP (long-term potentiation) essenziell notwendige Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren im Ganglion cervicale superius [Alkadhi et al. 1996; Alkadhi und Altememi 1997], so dass sowohl der Mastzelle selbst als auch dem von ihr sezernierten Serotonin eine Schlüsselrolle zukommt.

Serotonin kann andererseits auch als vasoaktives Amin Permeabilitätsänderungen von Gefäßen herbeiführen. Die Mastzelle ist mit ihren spezifischen Membranrezeptoren prinzipiell dort im Organismus vorzufinden, wo potenziell Noxen einen Zugang gewinnen können; häufig liegt die Mastzelle in dem die Venulen einschließenden Bindegewebe [Wasserman 1979; Galli 1993]. Perivaskuläre Mastzellen sind somit prinzipiell befähigt, durch ihre vasoaktiven Mediatoren die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu steigern [Theoharides et al. 1993; Silver et al. 1996; Zhuang et al. 1996; Dimitriadou et al. 2000].

In dieser Arbeit sind daher die Möglichkeiten der Beeinflussung neuronaler Aktivität durch die Mastzelle im sympathischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum sowie die topographische Beziehung der Mastzelle zu ganglionären Schrankenstrukturen (i.e. Perineurium und Gefäße) und deren mögliche Steuerung durch die Mastzelle von Interesse. Hierbei ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

- 1) Liegt die Mastzelle in den sympathischen Ganglien topographisch homogen verteilt, oder zeigen sich bevorzugte Positionen, sowohl in der Ganglienlängsachse als auch in Bezug auf Schrankenstrukturen wie Perineurium und Gefäße?
- 2) Kommt der ionotrope 5-HT₃-Rezeptor in den untersuchten Ganglien an Perikaryen, im Neuropil, an cholinergen Synapsen, an Satellitenzellen oder weiteren Zellen vor?
- 3) Findet man den metabotropen 5-HT_{2A}-Rezeptor an Gefäßen oder anderen ganglionären Strukturen? Welcher Anteil der Gefäße trägt im positiven Falle den Serotoninrezeptor und wie sind diese Gefäße zu klassifizieren?

Als Verfahren wurde die Immunhistochemie angewendet. Mit Hilfe der Primärantikörper gegen die in Klammern gerichteten Antigene wurden Mastzellen (Serotonin), 5-HT_{2A}-Rezeptoren, Endothelien und Perineurium (GluT-1, Glucosetransporter 1) sowie selektiv Endothelien (RECA-1, rat endothelial cell antigen), Neurone (PGP 9.5, protein gene product 9.5), Satellitenzellen (Vimentin), 5-HT₃-Rezeptoren sowie cholinerge Synapsen (VACHT, vesikulärer Acetylcholintransporter; Synaptophysin) immunhistochemisch markiert. Neben einer Einfachmarkierung von Serotonin wurden Doppelmarkierungen von Serotonin mit jeweils GluT-1 und RECA-1, eine Doppelmarkierung von GluT-1 und RECA-1 sowie des 5-HT_{2A}-Rezeptors und RECA-1 angefertigt; außerdem Doppelmarkierungen des 5-HT₃-Rezeptors jeweils mit PGP 9.5, VACHT, Synaptophysin und Vimentin. Danach erfolgte eine überwiegend elektronische Bildvermessung, um einerseits topographische Bezüge zweier Strukturen (Mastzelle - Perineurium, Mastzelle - Gefäße), andererseits die tragenden Strukturen der 5-HT_{2A}- und 5-HT₃-Rezeptoren (Gefäße, Neurone, Satellitenzellen sowie cholinerge Synapsen) hinsichtlich ihres Anteils sowie regionale Unterschiede quantitativ zu erfassen und statistisch auszuwerten.

1.2 Die sympathischen Ganglien „Ganglion cervicale superius“ und „Ganglion stellatum“

1.2.1 Epineurium

Der Begriff „Epineurium“ bezeichnet ein Bindegewebe mit Kollagenfasern und Fibroblasten, das die äußere Hülle eines Nerven um das Perineurium herum bildet [Burkel 1967; Dail und Barton 1983, Thomas und Olsson 1984]. Das Epineurium stellt feinstrukturell keinen kontinuierlichen Mantel dar und ist mit dem Bindegewebe, das Muskeln und Gefäße umhüllt, vergleichbar [Burkel 1967; Dail und Barton 1983; Thomas und Olsson 1984]. Die Kollagenfaserbündel sind vornehmlich parallel der Achse des Nerven orientiert [Dail und Barton 1983; Thomas und Olsson 1984], so dass das Epineurium eine longitudinale Zugelastizität bietet. Ferner durchdringen die Vasa nervorum das Epineurium, das auch über eine Lymphdrainage verfügt [Thomas und Olsson 1984]. Das Epineurium ist beim Ganglion cervicale superius der Ratte verhältnismäßig dünn ausgebildet [Forssmann 1964; Dail und Barton 1983].

1.2.2 Perineurium

Das Perineurium umgibt sowohl Nervenfaserbündel als auch die peripheren somatischen und autonomen Ganglien [Thomas und Olsson 1984] und stellt die Schicht zwischen Epineurium und Endoneurium dar [Burkel 1967]. Das Perineurium besteht aus polygonalen und abgeplatteten Zellen [Burkel 1967; Akert und Sandri 1976; Thomas und Olsson 1984]. Zwischen den Lagen dieser Perineuralzellen befinden sich Kollagenfasern und Fibroblasten [Akert und Sandri 1976]. Das Perineurium von Nerven der Mammalia besteht aus bis zu 15 solcher lamellärer Schichten, deren Zahl mit dem Nervendurchmesser abnimmt [Burkel 1967; Thomas und Olsson 1984]. Die glattrandig aneinanderliegenden Perineuralzellen sind über tight junctions miteinander verbunden [Andres 1967; Burkel 1967; Akert und Sandri 1976; Dail und Barton 1983; Takata et al. 1997]; oftmals werden die Zellverbindungen durch Maculae adherentes verstärkt [Akert und Sandri 1976]. Hierdurch unterscheiden sie sich von abgeplatteten Fibroblasten, die sich den Perineuralzellen lediglich annähern [Burkel 1967]. Die Perineuralzellen benachbarter Schichten sind gelegentlich auch durch Desmosomen verbunden; die tight junctions der Perineuralzellen und die Basallaminae besitzen Barrierefunktion [Andres 1967; Burkel 1967; Thomas und Olsson 1984]. Diese perineurale Schranke ist dicht und hoch selektiv [Burkel 1967; Akert und Sandri 1976; Thomas und Olsson 1984; Takata et al. 1997]. Perineuralzellen besitzen darüber hinaus eine ausgeprägte Pinozytosefähigkeit [Andres 1967, Burkel 1967; Akert und Sandri 1976], die an der externen und der internen Zellmembran von Endothelzellen gleichermaßen zu beobachten ist [Akert und Sandri 1976]. Der GluT-1 gilt als funktioneller Marker der perineuralen Barriere [Pardridge et al. 1990; Magnani et al. 1996; Takata et al. 1997].

Das Perineurium des Ganglion cervicale superius ist mit einer Dicke von 10 bis 14 μm und dichten, parallel ausgerichteten und zirkulär um das Ganglion verlaufenden Kollagenfasern bei der Ratte gut ausgebildet [Forssmann 1964; Dail und Barton 1983]. So finden sich auch zahlreiche perineurale Septen, die in das Ganglion einstrahlen [Dail und Barton 1983].

Das Perineurium zeigt Kontinuität und wird lediglich 1.) von schräg verlaufenden Gefäßen [Forssmann 1964; Burkel 1967] und 2.) durch ein offenes Ende des Perineuriums vor dem Ende des Nerven unterbrochen [Burkel 1967; Akert und Sandri 1976]. Das Perineurium kleiner vegetativer Nerven setzt sich auf abzweigende Nervenäste ein kurzes Stück fort und endet offen [Kerjaschki und Stockinger 1970]. Möglicherweise stellen die offenen Enden der Perineuralscheide einen Zugang zum Endoneuralraum dar [Burkel 1967]. An diesen Stellen stehen das epi- und endoneurale Kompartiment trotz ihrer fast vollständigen Trennung durch das Perineurium miteinander in Verbindung [Burkel 1967; Akert und Sandri 1976].

1.2.3 Endoneurium

Das Endoneurium kann als lockeres Bindegewebe angesehen werden. Es stellt die „innerste Umhüllung“ eines Nerven dar und besteht aus intrafaszikulärem Bindegewebe, das vom Perineurium eingeschlossen wird [Burkel 1967; Thomas und Olsson 1984]. Elektronenmikroskopisch stellt sich das Endoneurium als spaltförmiger Raum dar, der sich zwischen den Neuronen einschließlich ihrer Satellitenzellen befindet. Die Satellitenzellen zweier unterschiedlicher Neurone werden im Ganglion cervicale superius immer durch diesen Spaltraum voneinander getrennt [Forssmann 1964]. Das Endoneurium ist durch eine kontinuierliche Basalmembran gegenüber Satellitenzellen und „nackten“ Stellen der Axone und Dendriten abgegrenzt [Forssmann 1964]. Diese Basalmembran besitzt eine Dicke von 24 bis 35 nm und hat wahrscheinlich eine Filterfunktion im Sinne einer Schranke [Forssmann 1964].

Im Endoneurium werden elektronenmikroskopisch Kollagenfasern einer Dicke von 200 bis 300 nm, die auch der Dicke der perineural vorkommenden Fasern entspricht [Thomas und Olsson 1984], und verschiedene Zellarten gefunden [Forssmann 1964]. Obwohl die Kollagenfasern in der Nähe der Basalmembranen enger liegen, durchdringen sie diese nicht [Forssmann 1964]. Die Kollagenfasern verlaufen parallel mit den Nervenfasern sowie längs zwischen den Ganglienpolen [Forssmann 1964; Burkel 1967; Zenker 1994].

Man findet im Endoneurium Fibrozyten und Perizyten der Blutgefäße [Forssmann 1964; Thomas und Olsson 1984; Zenker 1994]; liegen die Fibrozyten in Gefäßnähe, so werden sie auch als „Adventitialzellen“ bezeichnet. Andres [1961] fand auf 6 bis 15 Satellitenzellen einen Fibrozyten; Forssmann [1964] berichtet über ein noch selteneres Auftreten dieser Zellen im Ganglion cervicale superius und vermutet, dass sie nur in Form der Adventitialzellen vorkommen.

Der Endoneuralraum nimmt beim N. ischiadicus etwa 20% des Faszikelvolumens ein und hat - im Gegensatz zum Epineurium - keine lymphatische Drainage [Dyck et al. 1984]. Das endoneurale Komparti-

ment wird durch eine Blut-Nerven-Schranke begrenzt, die sich aus endoneuralen Gefäßen und dem umkleidenden Perineurium zusammensetzt [Thomas und Olsson 1984]. Die Regulation des endoneuralen Milieus kann prinzipiell erfolgen durch 1.) die endoneuralen Gefäße, 2.) das Perineurium und 3.) die im Endoneuralraum befindlichen Zellen [Weerasuriya 1987].

1.2.4 Satellitenzellen

Der Begriff „Satellitenzellen“ für die Zellschicht zwischen Neuron und Interstitium wurde 1901 von Koelliker und 1909 von Roman y Cajal geprägt [Forssmann 1964]. Jedes Neuron ist von einer kontinuierlichen Satellitenzellschicht in Form sehr flacher Zellen umgeben [Zenker und Neuhuber 1994]; entgegen Befunden von Andres [1961], der über Zwillingszellen, also Neurone in einer gemeinsamen Satellitenzellscheide, für das Spinalganglion berichtet, zeigen die Befunde von Forssmann [1964], dass jedes Neuron im Ganglion cervicale superius seine eigene Satellitenzellscheide besitzt. Die Satellitenzellen von autonomen Ganglien sind an ihren Zellgrenzen miteinander verzahnt und durch tight junctions verbunden; die Satellitenzellen von sensiblen Ganglien sind lockerer um die Neurone angeordnet und weisen seltener tight junctions auf [Ten Tusscher et al. 1989]. Somit stellen Satellitenzellen in autonomen Ganglien möglicherweise generell für große Moleküle eine effektive Barriere dar, die in sensiblen Ganglien fehlt [Ten Tusscher et al. 1989].

1.2.5 Neurone

Aufgrund licht-, phasenkontrast- und elektronenmikroskopischer Befunde kann man bei allen Neuronen des Ganglion cervicale superius von einer einzigen Zellart ausgehen [Forssmann 1964]. Das sympathische, multipolare Neuron ist eine polygonale Zelle mit zahlreichen, sehr ähnlichen Ausläufern; der Durchmesser des Perikaryons beträgt 10 bis 30 µm [Forssmann 1964]. Die leicht elliptischen Kerne zeigen einen Durchmesser von 8 bis 13 µm; man findet nur einkernige Neurone im Ganglion cervicale superius der Ratte [Forssmann 1964].

Funktionell unterschiedliche sympathische Neurone lassen sich über ihre neurochemischen („chemische Kodierung“) und physiologischen Eigenschaften charakterisieren [Gibbins et al. 1996]. So unterscheiden sich die sympathischen, vasokonstriktorisches Motoneurone von den pilomotorischen Neuronen durch ihren Gehalt an Neuropeptiden und ihrer physiologischen, reflektorischen Antwort nach Aktivierung bestimmter Baro- oder Thermorezeptoren [Gibbins et al. 1996]. Vasokonstriktorisches Neurone, die kleine Arteriolen, Venulen oder arteriovenöse Anastomosen in der Haut innervieren, unterscheiden sich neurochemisch von denen, die größere Gefäße im selben arteriellen Stromgebiet versorgen, indem sie Dynorphin, aber nicht das Neuropeptid Y enthalten [Gibbins und Morris 1990]. Überdies zeigen präganglionäre Neurone eine funktions- und verschaltungsspezifische Ausstattung mit bestimmten Neuropeptiden. Die Endigungen präganglionärer, SP (Substanz P)-haltiger Neurone sind ausschließlich verschaltet mit

vasodilatatorischen Neuronen; Endigungen präganglionärer, CGRP (calcitonin gene-related peptide)-haltiger Neurone ausschließlich mit vasokonstriktorischen Neuronen [Gibbins 1992].

Sympathische Neurone lassen sich auch über die Zellgröße ihrer Perikaryen und dem Aufzweigungsmuster ihrer Dendriten unterscheiden [Gibbins et al. 1996]. Im Ganglion cervicale superius können mindestens vier Klassen von Neuronen aufgrund ihrer Größe und Verteilung differenziert werden: Vasokonstriktorische Neurone der Haut weisen im Durchschnitt die geringste Perikaryengröße auf, vasokonstriktorische Neurone mit Projektion in den Skelettmuskel haben größere, pilomotorische Neurone noch größere und sekretomotorische bzw. pupillomotorische Neurone besitzen die größten Perikaryen [Gibbins 1991; Gibbins et al. 1996]. Die im Perikaryendurchmesser kleineren Neurone, z. B. die vasokonstriktorischen, zeigen eher tonische Aktivität, wohingegen die größeren, z. B. die pilomotorischen oder die sekretomotorischen der Speicheldrüsen, zu unregelmäßiger und relativ kurzdauernder Aktivität neigen [Jänig 1988; Boczek-Funcke et al. 1992; Gibbins et al. 1996].

Der Durchmesser der Perikaryen sympathischer Neurone korreliert ferner mit der Größe des innervierten Zielfeldes; vasokonstriktorische Neurone der Skelettmuskulatur projizieren in ein größeres Gefäßgebiet als vasokonstriktorische Neurone der Haut; ferner besitzen sie größere motorische Einheiten [Gibbins et al. 1996]. Neurone des Ganglion cervicale superius, die zu den Gefäßen des M. masseter projizieren, besitzen einen deutlich größeren Durchmesser und höhere Leitungsgeschwindigkeit als solche, die zu den Gefäßen der Ohrhaut projizieren [Jänig 1988; Gibbins et al. 1996].

1.2.6 Synapsen

Im Ganglion cervicale superius der Ratte lassen sich dendrodendritische, dendroaxonale und dendrosomatische Synapsen finden [Forssmann 1964; Kiraly 1989]. Kiraly et al. [1989] beschreiben für das Ganglion cervicale superius der Ratte überdies synaptische Triaden, die zwei dendritische und eine präganglionäre Nervenendigung enthalten. In der Präsynapse findet man dichte Ansammlungen von synaptischen Vesikeln mit einem Durchmesser von 20 bis 60 nm. Die prä- und postsynaptische Membran ist durch einen Spalt von 10–15 nm voneinander getrennt, teilweise konfluieren die beiden Membranen; die Fläche einer synaptischen Membranverdickung beträgt 0,3 bis 0,5 μm^2 [Forssmann 1964].

1.2.7 Gefäße

Die sympathischen Ganglien zählen zu den metabolisch hochaktiven Geweben und benötigen eine suffiziente Blutversorgung [Dail und Barton 1983]. Gefäße verlaufen oftmals über die ein- und austretenden Nervenbündel zum Ganglion cervicale superius; die afferenten Gefäße sind meist kleine, muskuläre Arterien, die selbst sympathisch innerviert sind [Dail und Barton 1983; Zenker und Neuhuber 1994]. Viele Gefäße befinden sich in den perineuralen Septen [Dail und Barton 1983; Zenker und Neuhuber 1994]. Die an den beiden Polen in das Ganglion eintretenden Gefäße verlaufen wie die Nervenfasern und die Kolla-

genfasern des Endoneuriums parallel der longitudinalen Ganglienachse, wobei Querverbindungen selten zu finden sind [Forssmann 1964]. Ein Gefäß vom Kapillar-, Sinusoid- oder Venulentyp versorgt etwa drei Perikaryen; echte Arteriolen kommen sehr selten vor [Forssmann 1964]. Stattdessen findet man Metarteriolen und Präkapillaren im Ganglion cervicale superius, wie sie bei Moore und Ruska [1957] beschrieben sind. Im Bereich von Fensterungen der Arteriolen befinden sich zwischen Gefäßlumen und Interstitium lediglich das Endothel und die Basalmembran; da die Endothelzellen dort besonders viele Pinozytosebläschen enthalten, versteht man die Fensterungen als Diffusionserleichterung zum Stoffaustausch [Forssmann 1964].

1.2.8 SIF-Zellen

Sympathische Ganglien enthalten eine Population von sog. SIF (small intensely fluorescent)-Zellen, die durch ihren Gehalt an Katecholaminen eine intensive, durch Formalin induzierbare Fluoreszenz (Falck-Hillarp-Technik [Falck et al. 1962]) zeigen [Elfvin et al. 1975; Verhofstad et al. 1981; Dahlström und Fuxe 1999]. Für das Ganglion cervicale superius der Ratte sind drei Typen von SIF-Zellen beschrieben: Der häufigste Typ speichert Dopamin, ein anderer Noradrenalin, und ein dritter speichert Serotonin [Verhofstad et al. 1981; Eränkö 1986]. Aber auch Adrenalin ist in SIF-Zellen enthalten [Elfvin et al. 1975]. Die SIF-Zellen treten in Nestern bis zu vier Zellen im Ganglion cervicale superius der Ratte auf [Elfvin et al. 1975]; man findet sie am zahlreichsten an den beiden Polen des Ganglions [Verhofstad et al. 1981]. SIF-Zellen enthalten verschiedene Vesikelmembranproteine (Synaptophysin, Synaptotagmin I, Synaptobrevin II) [Hou und Dahlström 1996]. Es wird eine Funktion der SIF-Zellen als Interneurone oder Chemorezeptoren diskutiert; ferner besteht oft Kontakt zu Blutgefäßen [Elfvin et al. 1975; Verhofstad et al. 1981; Dail und Barton 1983; Eränkö 1986]. Letztlich ist ihre Funktion in sympathischen Ganglien noch nicht ausreichend geklärt [Eränkö 1986].

1.2.9 Verschaltung und Projektionen

Jedes Neuron des Ganglion cervicale superius wird im Schnitt von Wurzeln aus vier Rückenmarkssegmenten innerviert; eines dieser Segmente scheint immer zu dominieren [Dail und Barton 1983]. Die Neurone des Ganglion cervicale superius sind meist in projektionsorientierten Nestern in der Nähe ihres axonalen Austritts aus dem Ganglion zu finden [Dail und Barton 1983]. Eine präganglionäre Faser eines bestimmten Rückenmarksegmentes kann gleichzeitig mit postganglionären Neuronen am kranialen und am kaudalen Pol divergent verschaltet sein [Dail und Barton 1983; Zenker und Neuhuber 1994]. Durch retrograde Markierung zeigt sich eine topographische Orientierung der Neurone im Ganglion cervicale superius nach ihren Zielorganen (s. Abb. 1.1). Zu den Speicheldrüsen Gll. (Glandulae) parotis et submandibularis projizieren Neurone im kaudalen Teil des Ganglions, zur Iris und zur Harderschen Drüse Neurone im kranialen Teil [Dail und Barton 1983]. Man kann das Ganglion cervicale superius als Fusion zweier Neu-

renenpopulationen auffassen, von denen die kraniale vornehmlich Organe der Schädelhöhle inklusive der Orbita versorgt, die kaudale dagegen weiter kaudal liegende Organe des Kopfes, Halses und Thorax. Dies zeigt sich auch in der oftmals beobachteten zirkulären „Einschnürung“ im Zentrum des Ganglions [Dail und Barton 1983].

Das Ganglion cervicale superius besitzt zwei Hauptefferenzen. Der N. caroticus internus, der am kranialen Pol seinen Ursprung besitzt, und der N. caroticus externus, der im kaudalen Drittel des Ganglions entspringt und über den eine Verbindung zum IX. Hirnnerven besteht [Dail und Barton 1983]. Beim Ganglion stellatum orientieren sich die postganglionären Neurone topographisch eher an ihrer präganglionären, segmental gegliederten Innervation, so dass Neurone im kranialen Teil des Ganglions auch mit den kranialen, das Ganglion versorgenden Rückenmarksegmenten verschaltet sind [Dail und Barton 1983].

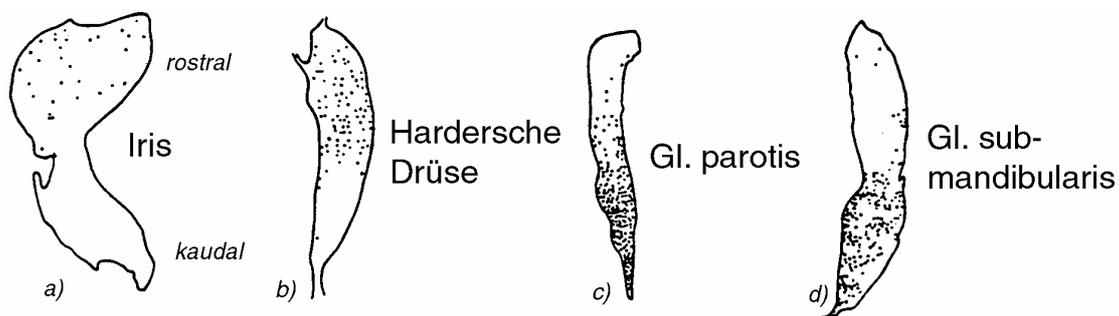


Abb. 1.1: Topographie und Projektionen der Neurone des Ganglion cervicale superius. Vornehmlich rostral befinden sich Neurone, die zur Iris und zur Harderschen Drüse (eine Salzdrüse) projizieren (a und b), im kaudalen Teil des Ganglions liegen Neurone, die die Speicheldrüsen Gl. parotis und submandibularis als Zielorgan haben (c und d). (Modifiziert nach Dail und Barton [1983])

1.3 Schrankenstrukturen und Energieversorgung des Nervensystems

1.3.1 Die Blut-Hirn-Schranke und die Energieversorgung des ZNS

Die Hauptenergiequelle für das Gehirn des Säugers, das vom systemischen Kreislauf durch die Blut-Hirn-Schranke isoliert wird, stellt Glucose dar [Dobrogowska et al. 1999]. Als strukturelle Basis einer Blut-Gewebe-Barriere dienen endo- oder epitheliale Zellen, die durch tight junctions untereinander verbunden und somit versiegelt sind, oder synzytiale Zellschichten [Takata et al. 1997]. Die Membranen von Kapillarendothelien des Gehirns stellen die Blut-Hirn-Schranke in vivo dar [Boado et al. 1990; Farrell et al. 1991; Dobrogowska et al. 1999]. Die Anwesenheit von Glucosetransporter-Proteinen ist essenziell für die Glucoseversorgung von Neuronen und Glia des Gehirns [Farrell et al. 1992; Mantych et al. 1993; Maher et al. 1994; Dobrogowska et al. 1999]. Der Transport von D-Glucose in das Gehirn ist stereospezifisch, energieunabhängig und zeigt eine Sättigung [Dobrogowska et al. 1999]. Der Hauptmechanismus dieses

transzellulären Glucosetransports stellt der in den Zellen der Barriere exprimierte GluT-1 dar, der die Diffusion von Glucose erleichtert [Farrell et al. 1992; Mantych et al. 1993; Takata et al. 1997; Dobrogowska et al. 1999]. Im Gehirn kommen mindestens drei Isoformen des Glucosetransporters vor [Maher et al. 1994], jedoch ist der GluT-1 die für die Blut-Hirn-Schranke entscheidende Isoform [Pardridge et al. 1990; Farrell et al. 1991, 1992; Mantych et al. 1993]. Der GluT-1 wird im Endothel der Mikrovaskularisation in die apikale und basolaterale Membran inseriert [Boado et al. 1990; Pardridge et al. 1990; Farrell et al. 1991, 1992]. Allenfalls minimal, wenn überhaupt, wird der GluT-1 von Neuronen und Glia exprimiert [Pardridge et al. 1990; Yu et al. 1998] und lässt sich immunhistochemisch nicht im Neuropil nachweisen [Farrell et al. 1991, 1992]. Der GluT-1 kommt in der 55-kDa Form in der Blut-Hirn-Schranke [Maher et al. 1994] und in der 45-kDa Form vor allem in Astrozyten und Oligodendrozyten vor [Maher et al. 1994; Yu et al. 1998]; Neurone exprimieren darüber hinaus den GluT-3 und Mikroglia den GluT-5 [Maher et al. 1994]. Fast 40% des endothelialen GluT-1-Proteins findet sich im Zytoplasma, was einen Mechanismus für eine bedarfsweise rasche Hochregulation der Geschwindigkeit des Glucosetransports durch eine Änderung der Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellmembran darstellt [Farrell et al. 1991; Dobrogowska et al. 1999].

Die lokale Steuerung der Entwicklung von tight junctions im Endothel der Hirnkapillaren hängt zum einen von astrozytären Faktoren [Arthur et al. 1987; Orte et al. 1999], und zum anderen von der extrazellulären Matrix ab [Arthur et al. 1987].

Die Blut-Hirn-Schranke entsteht in einem sehr frühen Stadium der Hirnentwicklung, möglicherweise während der intraneuralen Neovaskularisation [Bauer et al. 1995]. Der Funktionsbeginn dieser Schranke wird durch eine Beschränkung der GluT-1-Expression auf die intraneuralen Kapillaren repräsentiert; vor dem Einsetzen der intraneuralen Neovaskularisation zeigt sich starke GluT-1-Immunreaktivität im gesamten Neuroektoderm, aber nur wenig im perineuralen Gewebe [Bauer et al. 1995]. Ab dem 13. Tag der Embryonalentwicklung findet man bei der Ratte den GluT-1 in Gefäßen der Mikrovaskularisation in noch schwacher Ausprägung; in der folgenden Zeit nimmt die Quantität pro Gefäß bis zum Erwachseneniveau weiter zu [Bolz et al. 1996].

1.3.2 Die Blut-Nerven-Schranke und die Energieversorgung des peripheren Nerven

Der periphere Nerv weist, insbesondere an den Ranvierschen Schnürringen des Axons, einen hohen Energiebedarf auf. Zur Versorgung muss Glucose aus dem Endoneuralraum über die Plasmamembranen der Schwannschen Zelle und das Axolemma transportiert werden [Magnani et al. 1996]. Im peripheren Nerven findet man den GluT-1 ausgeprägt an endoneuralen Kapillaren und am Perineurium [Magnani et al. 1996; Tserentsoodol et al. 1999]. Man findet den GluT-1 weiterhin in der Zellmembran und im Zytoplasma von myelinisierenden Schwannschen Zellen im Bereich Ranvierscher Schnürringe und Schmidt-Lantermanscher Kerben, der dort einen transzellulären Glucosetransport ermöglicht [Magnani et al. 1996].

Der GluT-1 lässt sich jedoch nicht im Axolemma selbst finden [Magnani et al. 1996]. Der GluT-3 ist in myelinisierten Nervenfasern, endoneuralen Kapillaren und im Perineurium zu finden [Magnani et al. 1996]. Er ist somit für die Glucoseversorgung von Neuronen wesentlich [Mueckler 1994] und deckt deren basalen Glucosebedarf [Bell et al. 1990].

Im Gegensatz zum Gehirn haben in peripheren Ganglien große Moleküle Zugang zum extrazellulären Kompartiment, was mit dem Fehlen bzw. einer geringeren Wirksamkeit der Blut-Ganglien-Schranke im peripheren Nervensystem zusammenhängt [Dail und Barton 1983; Ten Tusscher et al. 1989]. Elektrophysiologische Experimente zeigen ebenfalls, dass das periphere Nervensystem von sehr viel leichter penetrierbaren Diffusionsbarrieren umgeben ist als das zentrale [Weerasuriya 1987]. Jedoch haben die Satellitenzellen in autonomen Ganglien für große Moleküle eine effektive Barrierefunktion [Ten Tusscher et al. 1989].

1.4 Die Mastzelle

1.4.1 Entwicklung

Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab, die sich in ihrer Entwicklung in zwei Hauptlinien teilen: Aus der lymphatischen Reihe entwickeln sich die Lymphozyten, und aus der myeloischen Reihe entstehen alle Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, Thrombozyten sowie die Mastzelle [Galli 1993; Lydyard und Grossi 1995]. Mastzellen haben somit den gleichen Ursprung wie alle Zellen der Hämatopoese [Lambracht-Hall et al. 1990; Galli 1993; Kitamura et al. 1993]; es ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt die Mastzelle von den Entwicklungslinien der Monozyten und der Granulozyten divergiert [Silver et al. 1996]. Der Verwandtschaftsgrad der Mastzelle zum Basophilen ist nicht ausreichend klar [Lydyard und Grossi 1995]. Ein großer Unterschied ihrer Entwicklungsprozesse ist, dass die Basophilen ihre Entwicklung im Knochenmark vollenden, während Mastzellen in unreifem Zustand aus dem Knochenmark in ihr Zielgewebe migrieren und dort reifen [Galli 1993; Kitamura et al. 1993; Wedemeyer et al. 2000]. Die Differenzierung der Mastzellen erfolgt ebenfalls im Zielgewebe, dort nehmen sie gemäß ihrer lokalen Mikroumgebung einen spezifischen Phänotyp an [Lambracht-Hall et al. 1990; Theoharides 1990; Silver et al. 1996]. Für die Entwicklung der Mastzelle im Zielgewebe sind sowohl T-Zell-abhängige als auch Fibroblasten-abhängige Mechanismen maßgeblich; für den Basophilen ist nur der T-Zell-abhängige Weg bekannt [Kitamura et al. 1993]. Das wichtigste Zytokin für die T-Zell-abhängige Mastzellentwicklung scheint IL-3 (Interleukin-3) zu sein [Theoharides 1990; Kitamura et al. 1993].

Unreife Mastzellen haben eine geringe Zahl von Granula und einen großen Kern mit einem prominenten Nucleolus [Ginsburg und Lagunoff 1967]. Die Entwicklung der Mastzellen verläuft von einer ungranulierten Vorläuferzelle über eine vorwiegend replikative Phase, der die Synthese spezifischer Granula folgt,

bis zu einem differenzierten Stadium, in dem sie ihre Teilungsfähigkeit eingestellt haben [Ginsburg und Lagunoff 1967].

1.4.2 Morphologie

Im Jahre 1863 fand Friedrich von Recklinghausen granuläre Zellen im ungefärbten Mesenterium des Frosches [von Recklinghausen 1863]. Paul Ehrlich beschrieb 1878 in seiner Dissertation die metachromatische Anfärbbarkeit der Mastzelle und des basophilen Granulozyten. Hierbei prägte er die Bezeichnung als „Mastzelle“, da ihm diese Zelle aufgrund ihrer Vielzahl an Granula als „gemästet“ erschien [Ehrlich 1878, 1879].

Jede Mastzelle besitzt mehrere hundert solcher Granula, die jeweils von einer Membran umgeben sind [Wasserman 1979; Lydyard und Grossi 1995]. Die Größe der Mastzellen steigt mit dem Alter eines Tieres stetig; die Volumenzunahme der Zelle ist mit einer Vermehrung der zytoplasmatischen Granula korreliert [Padawer 1979]. Die granuläre Matrix der Mastzelle ist ein dichter Komplex aus kationischen Proteinen, sauren Mukopolysacchariden, biogenen Aminen und Zink (Aufstellung s. Tab. 1.2) und verhält sich wie ein Ionenaustauschersieb [Padawer 1979; Lydyard und Grossi 1995; Andjelkovic und Pachter 1998]. Die Kohlenhydratkomponente der Granulamatrix unterliegt einem ständigen Reifungsprozess. Offenbar werden die Granula in den Fortsätzen des Golgi-Membran-Systems festgehalten, um dort kontinuierlich zu reifen [Padawer 1979].

Mastzellen besitzen nur spärliche Elemente des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ein Organell, das in die Export-Proteinsynthese eingebunden ist) und wenige Polyribosomen (die mit der zytoplasmatischen Proteinsynthese assoziiert sind) [Padawer 1979]. Das ist bemerkenswert, da etwa 30% der granulären Matrix aus Protein besteht, was darauf hindeutet, dass reife Mastzellen ihre Granula sehr langsam bilden [Padawer 1979]. Lässt man jedoch reife Mastzellen unter experimentellen Bedingungen degranulieren, unterliegen sie einer Art Blastogenese, ihr Syntheseapparat reexpandiert, und sie generieren neue Granula mit erhöhter Geschwindigkeit; dieser Rückkopplungsmechanismus scheint die Masse der Granula in situ zu regulieren [Padawer 1979]. Mastzellen besitzen relativ wenige Mitochondrien; auch das deutet auf eine normalerweise relativ geringe Syntheseleistung hin [Padawer 1979].

Die Oberfläche der Mastzellen ist vergrößert durch Microvilli, die kennzeichnend für Sekretion und für Absorption sind [Lydyard und Grossi 1995].

1.4.3 Vorkommen und Verteilung

Mastzellen kommen regelhaft gehäuft an grenzbildenden Oberflächen des Körpers vor; sie sind mit ihren spezifischen Membranrezeptoren also dort positioniert, wo potenziell Noxen in den Organismus eindringen können [Wasserman 1979; Galli 1993; Lydyard und Grossi 1995]. Die Mastzellen sind frei im Bronchiallumen lokalisiert, in der Mukosa der Bronchien und des Gastrointestinaltrakts, intraepithelial und

generell im Bindegewebe um die Venulen [Wasserman 1979; Galli 1993; Lydyard und Grossi 1995]. Mastzellen gehören somit zu den ersten Stationen, mit denen diverse Fremdstoffe und Mikroorganismen in Kontakt kommen.

Mastzellen werden in die zwei Haupttypen „Bindegewebsmastzelle“ und „Mukosamastzelle“ unterteilt [Bienenstock et al. 1989; Kitamura et al. 1993; Lydyard und Grossi 1995] aufgrund ihrer Lokalisation [Lydyard und Grossi 1995], des Inhalts ihrer Granula, ihrer Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, ihrer Antwort auf Sekretagoga sowie weiteren Faktoren [Bienenstock et al. 1989; Blennerhassett et al. 1991] (s. Tab. 1.1). Wahrscheinlich entstehen beide Subpopulationen aus derselben Vorläuferzelle; ihre phänotypische Ausgestaltung wird von der Umgebung bestimmt, in der sie heranwachsen [Brostoff und Hall 1995; Silver et al. 1996]. Theoharides [1990] erwähnt als weiteren Mastzelltypus die Hirn-Mastzelle. Zwischen den Bindegewebsmastzellen und den endoneuralen Mastzellen besteht aber histochemisch und ultrastrukturell kein deutlicher Unterschied [Kimura et al. 1988]. Mastzellen in verschiedenen Geweben, Arten und Entwicklungsstadien lassen sich überdies anhand der Proteoglykane ihrer Granula differenzieren; dieses Phänomen wird als „Mastzell-Heterogenität“ bezeichnet [Galli 1993; Wedemeyer et al. 2000].

Mastzellen an nahe beieinander liegenden Orten können sich grundlegend in ihrer Morphologie und ihren Inhaltsstoffen unterscheiden. In den Atemwegen der Ratte sind die Bindegewebsmastzelle der Lamina propria [Gibson und Miller 1986; Tam et al. 1988; Domeij et al. 1991] und die Mukosamastzelle des Epithels [Gibson und Miller 1986; Tam et al. 1988] beschrieben, die in der Literatur auch als „globule leucocyte“ bezeichnet wird [Lidegran et al. 1996].

	Bindegewebsmastzellen	Mukosamastzellen
Vorkommen	perivaskuläre Lage, ubiquitäres Vorkommen	Darm und Lunge
Lebensdauer	>40 Tage	<40 Tage
Größe, Morphologie	10-20 µm, mehr Granula	5-10 µm, weniger Granula
biogene Amine	hoher Histamingehalt	geringer Histamingehalt
kennzeichnendes Proteoglykan	Heparin	Chondroitinsulfat
Wachstum	T-Zell-unabhängig	T-Zell-abhängig
	Degranulation und Verschwinden nach Gabe von Substanz 48/80	Degranulation und Verschwinden nach Gabe von Kortikosteroiden
Zahl der oberflächlichen Fcε-Rezeptoren pro Zelle	3*10 ⁴	25*10 ⁵

Tab. 1.1: Eigenschaften von Bindegewebs- und Mukosamastzellen (Nach Pepys [1979]; Skofitsch et al. [1985]; Tam et al. [1988]; Bienenstock et al. [1989]; Galli [1993]; Brostoff und Hall [1995]).

1.4.4 Mediatoren und Inhaltsstoffe der Mastzelle

Bei der Degranulation werden sowohl Inhaltsstoffe der Granula als auch de-novo synthetisierte Substanzen wie Derivate der Arachidonsäure und Zytokine liberiert [Galli 1993; Wedemeyer et al. 2000]. Mastzellen produzieren viele Mediatoren, darunter Histamin, Serotonin, Interleukine, GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor), eine Vielzahl von Proteoglykanen, Proteasen und Neuropeptide sowie Stickstoffmonoxid [Andjelkovic und Pachter 1998]. Jedoch sind Mastzellen eine heterogene Population; keine Mastzelle enthält gleichzeitig alle dieser Substanzen in ihren Granula [Silver et al. 1996]. Trotzdem kommen in allen Säugetiermastzellen dieselben Substanzklassen in den Granula vor [Padawer 1979]. Es finden sich beispielsweise verschiedene Heparine; bei dem präformierten Amin kann es sich um Histamin, Serotonin oder Dopamin handeln - in manchen Fällen, wie bei der Ratte, finden sich Histamin und Serotonin kombiniert [Padawer 1979; Andjelkovic und Pachter 1998] (s. Tab. 1.2.).

Mastzellen enthalten in ihren Granula Proteasen. Dazu zählen Chymase und Trypsase, deren Verhältnis und Gehalt pro Zelle kennzeichnend für bestimmte Mastzellsubtypen ist [Brostoff und Hall 1995].

Zu den Arachidonsäuremetaboliten der Mastzelle gehören PGD₂, (Prostaglandin D₂) PGE₂, PGI, PGF_{2α}, PGG₂, PGH₂ und TxA (Thromboxan A); sie werden bei der Degranulation de-novo synthetisiert [Wasserman 1979; Andjelkovic und Pachter 1998].

Zu den vasoaktiven bzw. auf die glatte Muskulatur wirkenden Mediatoren der Mastzelle zählen Histamin, Serotonin, SRS-A (slow-reacting substance of anaphylaxis), PAF (platelet activating factor) und verschiedene Prostaglandine [Wasserman 1979].

Zu den Mediatoren der Mastzelle mit chemotaktischer Wirkung zählen ECF-A (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis), die ECF-Oligopeptide, NCF (neutrophil chemotactic factor) und Histamin [Wasserman 1979]. ECF-A bewirkt eine chemotaktische Anziehung von Eosinophilen und Neutrophilen [Wasserman 1979; Galli 1993]. NCF zieht die Neutrophilen in vitro an und deaktiviert sie [Wasserman 1979]. Histamin aktiviert via H₁-Rezeptoren Eosinophile, kann sie jedoch über H₂-Rezeptoren zusammen mit Neutrophilen deaktivieren [Wasserman 1979]. Histamin moduliert somit die Migration der Leukozyten.

NGF (nerve growth factor) wird in den Mastzellen selbst synthetisiert und wirkt chemotaktisch auf weitere Mastzellen; ferner bewirkt NGF auch eine Hypertrophie und Hyperplasie der Mastzellen selbst [Aloe und Levi-Montalcini 1977; Bienenstock et al. 1989; Woolf et al. 1994]; darüber hinaus kann NGF die Antigen-induzierte oder Sekretagoga-induzierte Degranulation der Mastzelle verstärken [Tomioka et al. 1988].

Die Inhaltsstoffe der Granulamatrix erfahren kaum Umsetzungen. Markiertes Histamin zeigt zumindest für 51 Tage keinen Umsatz, granuläres Chymotrypsin für mindestens 30 Tage und markiertes Heparin für wenigstens 6 Wochen [Padawer 1979]. Hierdurch zeigt sich auch die im Vergleich zum Basophilen sehr lange Lebensdauer der Mastzelle [Wedemeyer et al. 2000].

Substanzklasse	Vertreter
Biogene Amine	Histamin, Serotonin, Dopamin
Zytokine	IL-1, -3, -4, -5, -6, -8, -10, -13, -16, TNF α (tumor necrosis factor α), GM-CSF, IFN γ (Interferon γ), TGF β (transforming growth factor β)
Enzyme	Saure Hydrolase, Chymase, Tryptase, Phospholipasen, Arylsulfatase, Basophil lung kallikrein of anaphylaxis, Proteasen I und II der Rattenmastzelle
Arachidonsäurederivate	Prostaglandine, Leukotriene, PAF
Nukleotid-Triphosphate	ATP (Adenosin-Triphosphat)
Neuropeptide	VIP (vasoactive intestinal peptide)
Stickstoffmonoxid	NO
weitere Peptide	ECF-A, ECF-Oligopeptide, NCF, NGF
Proteoglykane	Heparin, Chondroitin-4- und -6-sulfat, Dermatansulfat

Tab. 1.2: Bei der Mastzeldegranulation liberierte Substanzen

Nach Padawer [1979], Wasserman [1979], Galli [1993], McKay und Bienenstock [1994], Silver et al. [1996], Andjelkovic und Pachter [1998], Wedemeyer et al. [2000].

1.4.5 Vorkommen und Produktion von IgE

Ein IgE-Molekül (Immunglobulin E) besitzt fünf Domänen in der schweren Kette, das Molekulargewicht beträgt 188 kD (Kilodalton); es ist somit schwerer als IgG (Immunglobulin G), das nur 146 kD wiegt [Brostoff und Hall 1995; Tkaczyk et al. 2004]. Die IgE-Produktion unterliegt der T-Zell-Kontrolle. Man unterscheidet zwei Populationen von T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen), die sich durch das Profil der von ihnen produzierten Lymphokine charakterisieren lassen [Brostoff und Hall 1995; Tkaczyk et al. 2004]. Die T_H1-Zellen stellen IFN γ und IL-2 her, wohingegen die T_H2-Zellen IL-4 und IL-5 produzieren (s. Abb 1.2). Während der Immunantwort werden vorwiegend T_H2-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen stimuliert, deren daraufhin liberiertes IL-4 die IgE-Produktion seitens der B-Zellen fördert (s. Abb. 1.2). T_H2-Zellen supprimieren durch das ebenfalls von ihnen sezernierte IL-10 die T_H1-Antwort.

Die T_H1-Zellen setzen IFN γ frei, das zur Produktion von IgG2a durch B-Zellen und Repression der T_H2-Antwort auf das Antigen führt (s. Abb. 1.2). Von T_H2-Zellen ausgeschüttetes IL-10 hemmt somit die IFN γ -Produktion der T_H1-Zellen, das wiederum die Stimulation von B-Zellen durch T_H2-Zellen blockieren würde. Durch diese doppelte Inversion kann sich die T_H2-Antwort im Sinne einer positiven Rückkopplung selbst fördern. Die IgE-Syntheserate korreliert daher positiv mit dem Gehalt an IL-4 und negativ mit dem IFN γ -Spiegel. Die IgE-Produktion hängt weiterhin von der Aktivität von T-Suppressorzellen ab, deren Aktivität die T_H2-vermittelte Immunantwort hemmt [Brostoff und Hall 1995; Tkaczyk et al. 2004].

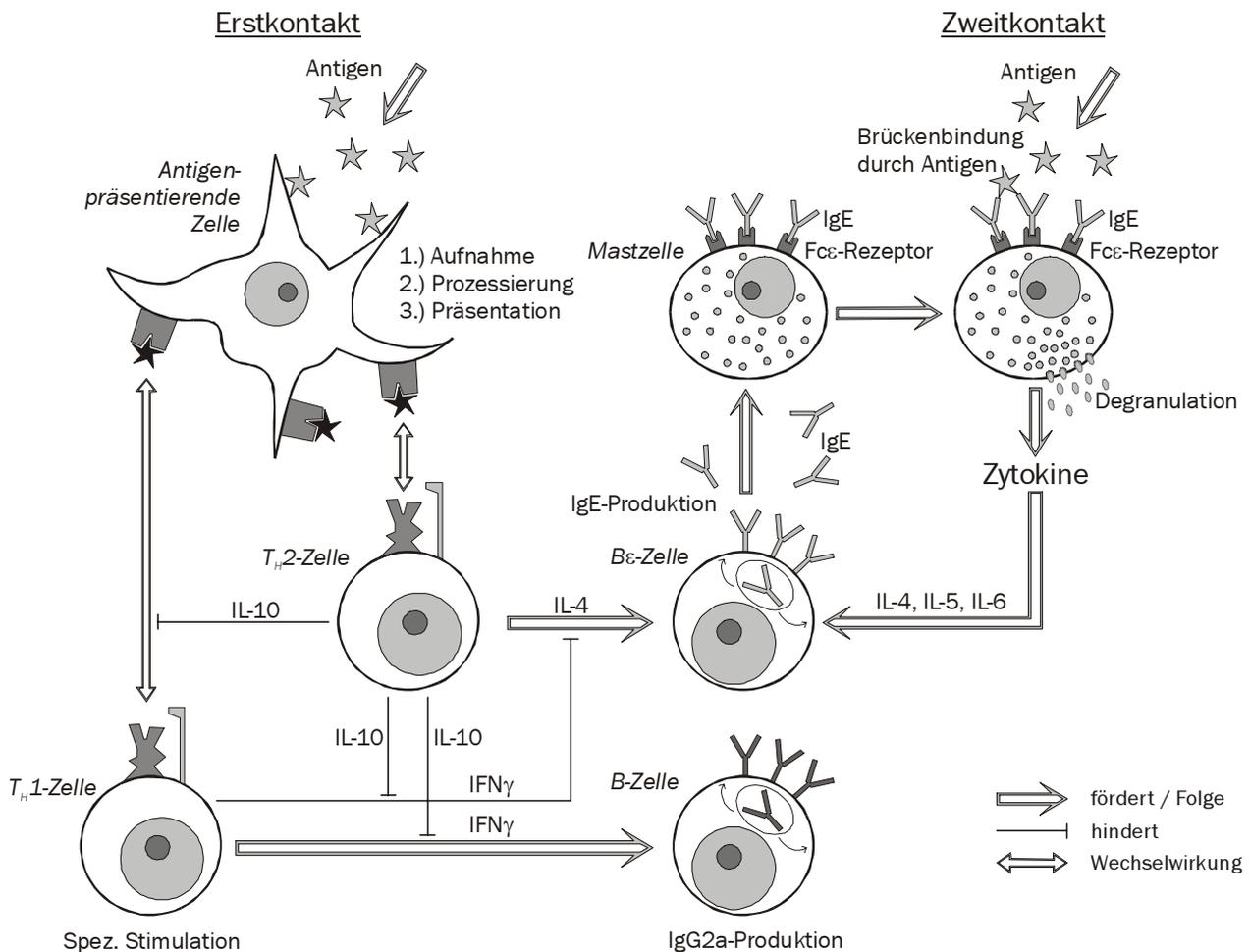


Abb 1.2: Regulation der IgE-Produktion und Ablauf einer allergischen Reaktion [Schema erstellt nach Brostoff und Hall 1995, Wedemeyer et al. 2000, Tkaczyk et al. 2004]

Das lokal entstehende IgE sensibilisiert zuerst die ortsansässigen Mastzellen, ehe der Überschuss in den Blutkreislauf übertritt und an zirkulierende basophile Granulozyten sowie an gewebständige Mastzellen im gesamten Organismus bindet [Brostoff und Hall 1995; Tkaczyk et al. 2004]. IgE kommt normalerweise im Serum nur in Spuren vor ($< 0,001\%$ des gesamten Immunglobulins im Serum) [Brostoff und Hall 1995]. Der IgE-Spiegel ist jedoch bei allergischen Reaktionen oft erhöht und kann auch bei parasitären Erkrankungen ansteigen. Die Halbwertszeit von IgE im Serum beträgt $2\frac{1}{2}$ Tage; Mastzellen bleiben nach einem Serumkontakt mit IgE bis zu 12 Wochen lang sensibilisiert [Brostoff und Hall 1995].

1.4.6 Fc-Rezeptoren für IgE

Es existieren zwei verschiedene, oberflächliche Rezeptoren für IgE. Der „klassische“ IgE-Rezeptor ist der hochaffine $Fc\epsilon RI$ -Rezeptor und kommt auf Mastzellen, Basophilen und auf Langerhans-Zellen vor [Ravetch und Kinet 1991; Haas et al. 1997; Wedemeyer et al. 2000; Tkaczyk et al. 2004]. Der hochaffine

FcεRI-Rezeptor ist strukturell ein Tetramer, das aus einer α-Kette, einer β-Kette und zwei γ-Ketten besteht [Ravetch und Kinetic 1991; Brostoff und Hall 1995; Tkaczyk et al. 2004]. Weiterhin findet sich vornehmlich auf Leukozyten und auf einer Subpopulation von Langerhans-Zellen der nasalen Mukosa [Haas et al. 1997] als niedrigaffiner IgE-Rezeptor der FcεRII-Rezeptor; im Gegensatz zum FcεRI-Rezeptor entstammt er nicht der Immunglobulinsuperagen-Familie [Ravetch und Kinetic 1991; Brostoff und Hall 1995].

1.4.7 Aktivierung und Stabilisierung der Mastzelle

Mastzellen lassen sich auf immunologische und nicht-immunologische Weise aktivieren (vgl. Tab. 1.3).

Der bekannteste und pathophysiologisch relevanteste Aktivierungsweg verläuft über IgE. Durch eine Dimerisierung des an die FcεRI-Rezeptoren der Mastzellen gebundenen IgE kommt es zur Degranulation, die durch Entkopplung der IgE-Moleküle ebenso rasch gestoppt wird [Wasserman 1979; Brostoff und Hall 1995; Wedemeyer et al. 2000; Tkaczyk et al. 2004]. Diese Brückenbindung von IgE-Molekülen kann durch ein bivalentes oder multivalentes Antigen oder andere Moleküle (z. B. Anti-IgE-Antikörper, s. Tab. 1.3) erfolgen [Wedemeyer et al. 2000; Tkaczyk et al. 2004].

In vivo regen auch Spaltprodukte der Komplementaktivierung, C3a und C5a, die Degranulation der Mastzelle an; sie besitzt für diese beiden, aufgrund ihrer hohen degranulationsinduzierenden Potenz auch als „Anaphylatoxine“ benannten Substanzen, spezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche [Wasserman 1979; Brostoff und Hall 1995]. Ferner trägt die Mastzelle auch Rezeptoren für C3b [Wasserman 1979].

Es existieren einige Substanzen, die Mastzellen auf nicht-immunologischem Weg, d.h. ohne die Einbeziehung von Fcε-Rezeptoren, aktivieren können. Dazu gehören die Histaminliberatoren Substanz 48/80, Kalzium-Ionophore und Mellitin sowie Pharmaka wie Codein, Morphin und Radiokontrastmittel (vgl. Tab. 1.3). Auch die Aktivierung der Phospholipase C, etwa als Nebenwirkung bestimmter Pharmaka, erhöht die zytosolische Kalziumkonzentration der Mastzelle bis zur Auslösung der Degranulation [Göthert und Schlicker 2001].

Eine Triggerung der Mastzelldegranulation kann über Neurotransmitter erfolgen [Shanahan et al. 1985; Blennerhassett et al. 1991]. SP ist ein Neuropeptid, das im Gegensatz zu anderen Neuropeptiden wie Endorphinen, Enkephalinen, VIP und Somatostatin die Degranulation sowohl von Bindegewebsmastzellen als auch von Mukosamastzellen auslöst [Shanahan et al. 1985].

Sexualhormone können direkt und indirekt die Freisetzung sowie die erneute Einspeicherung des Granulinhaltigen von Mastzellen beeinflussen [Silver et al. 1996]. Peritonealmastzellen der Ratte exprimieren Östrogenrezeptoren [Theoharides et al. 1993]. Die SP-induzierte Sekretion von biogenen Aminen kann durch Östradiol verstärkt und durch Tamoxifen blockiert werden [Vliagoftis et al. 1992]. Glukokortikoide haben auf Mastzellen komplexe Einflüsse, die abhängig von der Dosis, dem Mastzelltyp und Expositionsdauer sind [Silver et al. 1996]. Obwohl Glukokortikoide in vitro wenig Einfluss haben auf die IgE-vermittelte Histaminsekretion von Hautmastzellen, bewirken sie eine rasche Herunterregulierung vieler

Zytokine wie TNF α [Wershil et al. 1995]. Jedoch wurde der Einfluss von Glukokortikoiden auf Mastzellen des Nervensystems bislang wenig untersucht.

Die Inhibition der Antigen-induzierten Degranulation kann durch einen Anstieg des cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-Spiegels in der Mastzelle erfolgen [Mongar und Foreman 1979]. Durch β_2 -Sympathomimetika [Barnes 1995] und Phosphodiesterasehemmer lässt sich auf dem Wege einer cAMP-Erhöhung die Mastzelldegranulation inhibieren [Pauwels und Van Der Straeten 1979]. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels inaktiviert den für die Degranulation notwendigen Kalziumeinstrom [Mongar und Foreman 1979].

Mechanismus	Substanz
Immunologisch: Kreuzvernetzung des gebundenen IgE	Antigen („Allergen“)
	Anti-IgE-Antikörper
	Lectine: Phytohämagglutinin, Concanavalin A
Nicht-immunologisch	Anaphylatoxine: C3a und C5a
	Sekretagoga: Kalzium-Ionophore, Substanz 48/80, Mellitin
	Pharmaka: Codein, Morphin, synthetisches ACTH (adrenocorticotropes Hormon), Röntgenkontrastmittel
	Neuropeptide: VIP, Neurotensin, Somatostatin, SP, CGRP

Tab. 1.3: Mechanismen zur Induktion der Mastzelldegranulation. Nach Wasserman [1979], Skofitsch et al. [1985], Brostoff und Hall [1995], Kubes und Granger [1996], Baluk [1997].

1.4.8 Degranulation der Mastzelle

Durch die Brückenbindung bzw. Dimerisierung der gebundenen IgE-Antikörper kommt es zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration der Mastzelle und Verminderung der cAMP-Konzentration [Wasserman 1979; Göthert und Schlicker 2001]. Der Kalziuminflux ist essenziell für eine signifikante Erhöhung der Histaminfreisetzung [Ishizaka 1979; Mongar und Foreman 1979]. Er bewirkt in der Hauptsache zweierlei: Zum einen kommt es zur exozytotischen Freisetzung präformierter, in den Granula gespeicherten Mediatoren; zum anderen beginnt eine De-novo-Synthese von Mediatoren aus dem Arachidonsäurestoffwechsel [Duffy et al. 2001]. Der Kalziumeinstrom wird über einen Kalzium/Natrium-Austauscher kontrolliert, der von der membranständigen Natrium/Kalium-ATPase abhängt [Batchelor 1979]. Ionenströme von Kalium- und Chloridionen steuern während der Mastzellaktivierung über das Membranpotential den Kalziumeinstrom [Duffy et al. 2001].

Die Granula schwellen bei der Degranulation innerhalb des Zytoplasmas an und bewegen sich gleichzeitig zentrifugal [Padawer 1979]. Der Einstrom von Mineralkationen bedingt Konformationsänderungen der

granulären Matrix, die eine Expandierung und eine Freisetzung der gebundenen Amine verursacht [Padawer 1979]. Das steigert plötzlich stark den lokalen osmotischen Druck, und dadurch zieht Wasser in die Granula [Padawer 1979]. Die Kombination von Schwellung der Granula und Wassereinstrom bewirkt eine Weitung von Porenöffnungen des Plasmalemmes [Padawer 1979]. Eine Teilnahme von cAMP-abhängigen Proteinkinasen und mikrofilamentähnlichen kontraktile Elementen an Vorgängen der Degranulation wird ebenso angenommen [Wasserman 1979]. Infolgedessen fusionieren bei der Degranulation die Granulamembranen untereinander und mit der Zellmembran [Wasserman 1979]. Die Synthese neuer Granula scheint unmittelbar nach der Degranulation einzusetzen [Chakravarty 1979].

Mastzellen besitzen zwei Modi der Degranulation. Zum einen können sie, getriggert über Brückenbindung von IgE-Molekülen auf der Zelloberfläche, eine explosionsartige Degranulation zeigen, zum anderen kann die Degranulation langsam und in geringerer Intensität erfolgen; letzterer Sekretionsprozess steht unter der Kontrolle Nicht-IgE-verwandter Stimuli [Dvorak et al. 1999].

1.4.9 Überempfindlichkeitsreaktionen und Allergie

Der Begriff der Allergie wurde bereits 1906 von Clemens Johann von Pirquet geprägt und bedeutet das „Andersreagieren“ (griech.: $\alpha\lambda\lambda\omega\zeta$ $\epsilon\rho\gamma\omicron\nu$ = andere Verrichtung) [Brostoff und Hall 1995; Stadler 1997]. Es ist damit eine veränderte Reaktivität des Organismus beim zweiten oder folgenden Kontakt mit einer Substanz gemeint [Brostoff und Hall 1995]. Diese Reaktion kann lokal begrenzt sein oder in Form eines Schocks den ganzen Organismus erfassen.

Es wurden von Coombs und Gell [1975] vier Typen der Überempfindlichkeitsreaktion beschrieben, zu denen sich jeweils ein physiologisches Äquivalent der Abwehrreaktion finden lässt, die somit lediglich als „überschießende Ausprägung einer physiologischen Reaktion“ gelten können [Brostoff und Hall 1995]. Kennzeichnend für die ersten drei Typen der Überempfindlichkeitsreaktion nach Coombs und Gell ist deren an Antikörper gebundene Vermittlung, hingegen wird die Überempfindlichkeitsreaktion Typ IV von T-Zellen und Makrophagen bestimmt [Brostoff und Hall 1995].

Voraussetzungen für das Auftreten einer Überempfindlichkeit sind zum einen das Vorliegen eines geeigneten Antigens und zum anderen die Veranlagung zur übermäßigen Produktion von bestimmten Antikörpern oder T-Zellen [Kaufmann 2001].

Kennzeichnend für die Überempfindlichkeitsreaktion Typ I ist das unmittelbare Einsetzen nach dem Kontakt mit dem Antigen (Allergen) [Brostoff und Hall 1995]. Als zentrales Ereignis wird die Interaktion eines Antigens mit spezifischen, mastzellgebundenen Antikörpern und der konsekutiven Liberation von Mediatoren angesehen [Cavalcante de Albuquerque et al. 1996; Wedemeyer et al. 2000].

Die allergische Reaktion läuft folgendermaßen ab. Während der Sensibilisierungsphase werden gegen Umweltantigene spezifische IgE-Antikörper gebildet. Hierzu wird das Antigen von einer Antigen-präsentierenden Zelle aufgenommen, prozessiert und einer passenden T_H2 -Zelle präsentiert, die wiederum

eine B ϵ -Zelle via IL-4 zur IgE-Produktion stimuliert (s. Abb. 1.2). Kommt eine mit solchen IgE-Antikörpern beladene Mastzelle mit dem homologen Antigen in Berührung („Zweitkontakt“), so werden zwei nebeneinanderliegende Antikörpermoleküle durch das Antigen kreuzvernetzt („Brückenbindung“, „Dimerisierung“). Es kommt zur Degranulation der Mastzelle, wobei Substanzen wie Histamin, Serotonin, Heparin, PAF, Prostaglandine und weitere Zytokine frei werden. Durch IL-4 und IL-5 wird die spezifische B ϵ -Zelle zur weiteren IgE-Produktion veranlasst (positive Rückkopplung).

1.4.10 Markierung und Identifizierung der Mastzelle

In der Vergangenheit nahm man an, dass Mastzellen eine einheitliche Population darstellten, die in ihrer Struktur mit der heute bekannten Bindegewebsmastzelle weitgehend identisch ist. Eine Formalinfixierung und anschließende Färbung mit Toluidinblau markiert deutlich diese Bindegewebsmastzellen, jedoch in unzureichender Weise die Mukosamastzellen [Brostoff und Hall 1995].

Mastzellen lassen sich histologisch anhand der metachromatischen Eigenschaften ihrer Granula identifizieren, die abhängig von der Anwesenheit und dem Grad der Sulfatierung von Proteoglykanen wie Heparin sind [Silver et al. 1996; Wedemeyer et al. 2000]. Außerdem gelingt die Identifizierung über ihren Gehalt an Aminen und Neuropeptiden [Galli 1990]. Diese Eigenschaften variieren während der Mastzellentwicklung und bestimmen den Phänotyp der Mastzelle; sie sind ferner abhängig von gewebsspezifischen Signalen [Galli 1990]. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass in der Ratte gleichzeitig Mastzellen unterschiedlicher Phänotypen und Funktionen vorkommen [Bienenstock et al. 1989].

Mastzellen der Ratte lassen sich über ihr endogenes Serotonin immunhistochemisch darstellen, da die Mastzellen über große Mengen Serotonin verfügen [Lethosalo et al. 1984; Skofitsch et al. 1985]. Sie sind dabei leicht an ihrer polyedrischen Form und ihren großen Granula erkennbar [Skofitsch et al. 1985].

1.5 Morphologische und funktionelle Beziehung der Mastzelle zum Nervensystem

1.5.1 Das Vorkommen der Mastzelle im zentralen Nervensystem

Prinzipiell können alle Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie, Lymphozyten sowie Mastzellen in das ZNS (zentrales Nervensystem) migrieren und dort resident sein [Silver et al. 1996]. Die Ausstattung des ZNS mit immunkompetenten Zellen hängt vom Gesundheitszustand ab; unter pathologischen Bedingungen wandern zusätzliche Typen der Immunzellen ein [Silver et al. 1996]. Es hat sich gezeigt, dass Mastzellen sowohl das ZNS durchqueren als auch dort resident sind [Silver et al. 1996]. Mastzellen gelangen während ihrer Entwicklung in das Gehirn mittels Durchwanderung von Blutgefäßen, mit denen sie in Verbindung bleiben [Silver et al. 1996]. So findet man sie vornehmlich perivaskulär lokalisiert in der Ad-

ventitia von Arteriolen und Venulen, jedoch nicht im Kapillarbett [Dimitriadou et al. 1987; Theoharides 1990; Theoharides et al. 1993; Silver et al. 1996]. Der genaue Zeitpunkt, zu dem Mastzellen im Gehirn erstmals auftauchen, ist jedoch nicht bekannt [Lambracht-Hall et al. 1990]. Während der letzten Embryonalperiode und den ersten Tagen nach der Geburt finden sich Mastzellen ausschließlich in der Pia mater des Diencephalons; zwischen dem 11. und 13. postpartalen Tag migrieren die Mastzellen über die Gefäße in Hippocampus und Thalamus, und nach dem 13. Tag unterscheidet sich die Verteilung der Mastzellen im Gehirn nicht mehr von der adulter Ratten [Lambracht-Hall et al. 1990].

Die Mastzellen im Gehirn von Nagetieren sind wie folgt verteilt: Am zahlreichsten kommen sie im Diencephalon vor, weniger zahlreich im Telencephalon und im Mesencephalon, und am seltensten sind sie im Metencephalon und im Myelencephalon zu finden; in der Medulla spinalis lassen sich keine Mastzellen entdecken [Dropp 1972].

Die Hirnmastzellen enthalten ähnliche Proteoglykane wie die Peritonealmastzellen [Dimitriadou et al. 1990]. Neben der gefäßnahen Lage der Mastzellen ist auch eine enge topographische Beziehung der Hirnmastzellen zu Neuronen bekannt, die über NGF reguliert werden könnte [Theoharides 1990].

Es ist eine bemerkenswerte Variabilität der Zahl und Verteilung von Mastzellen zwischen Arten, Individuen und beiden Geschlechtern festzustellen, die bislang als nicht verstanden gilt [Silver et al. 1996; Silverman et al. 2000]. Auch unter verschiedenen physiologischen Bedingungen kann die Zahl der Mastzellen im zentralen Nervensystem sprunghaft ansteigen [Silverman et al. 2000]. So haben beispielsweise gebärende Ratten postpartal wesentlich mehr Mastzellen im Thalamus als die jungfräulichen [Silverman et al. 2000]. Bei sexuell aktiven Tauben zeigt sich nach kurzer Brautwerbung ein deutlicher Anstieg der Mastzellzahl in der medialen Habenula im Vergleich zu Kontrollen [Silver et al. 1996]. Ratten, die zur Simulation von sozialer Isolation in Einzelkäfige umgesetzt wurden, zeigten einen Tag später eine Reduktion der thalamischen Mastzellen um 90%, deren Zahl sich in den folgenden Tagen auf 44-67% der gemeinsam gehaltenen Kontrolltiere stabilisiert [Bugajski et al. 1994].

1.5.2 Das Vorkommen der Mastzelle im peripheren Nervensystem

Sowohl Bindegewebs- als auch Mukosamastzellen finden sich gesamten peripheren Nervensystem in enger struktureller Beziehung zu neuronalen Strukturen [Olsson 1968, 1971; Heine und Förster 1975; Blennerhassett 1991]. Das Serotonin des N. ischiadicus wird produziert und gespeichert von Mastzellen des Bindegewebstyps [Olsson 1965], die hauptsächlich entlang der Blutgefäße des Epineuriums lokalisiert sind [Olsson 1968]. Weiterhin finden sich Mastzellen innerhalb des Perineuriums sowie im Endoneurium; hier liegen sie sogar zwischen den Axonen und nahe an Schwannschen Zellen, jedoch ohne topographischen Bezug zu Blutgefäßen [Enerbäck et al. 1965]. Mastzellen zeigen eine diffuse Verteilung im Endoneuralraum des peripheren Nerven und den Interzellularräumen im Ganglion spinale [Kimura et al. 1988].

Einzig dünnkalibriges Kollagen des Endoneuralraumes sowie das Zytoplasma der Schwannschen Zellen trennen die Mastzelle von sensiblen Fasern der Dermis [Dyer 1978].

In der Zunge der Ratte finden sich submukös gelegene Mastzellen in der Umgebung von Nervenfasern, Blutgefäßen und quergestreifter Muskulatur [Chapman 1999]. Terminale vegetative Fasern können in sehr engen, „neuroeffektorischen“ Kontakt mit Mastzellen treten [Heine et al. 1975]. Zwischen einer Nervenfasern und der Mastzelle bleibt eine Distanz von maximal 20 nm erkennbar [Heine et al. 1975]. Obwohl ein typischer synaptischer Spalt fehlt, zeigt die der Mastzelle gegenüberliegende Zellmembran Einstülpungen, die auf Pinozytose hindeuten [Heine et al. 1975]. Außer einer neuronalen Beeinflussung können Mastzellen die stark ausgeprägte mikropinozytotische Aktivität der Perineuralzellen modulieren [Dyer 1978].

Die Mastzellen des peripheren Nerven zeigen unter pathologischen Bedingungen vermehrte Aktivität. Während der Wallerschen Degeneration degranulieren endoneurale Mastzellen auf der geschädigten Seite des Nerven, wobei sie aus ihren Granula Serotonin liberieren [Olsson 1965], das darauf die Permeabilität des Gefäßbetts erhöht [Harvey et al. 1994; Ullmer et al. 1995] und hierdurch zum Ablauf einer Entzündungsreaktion und letztlich zur Gewebereparatur beiträgt [Harvey et al. 1994]. Schwannsche Zellen und das Gefäßbett tragen im peripheren Nerven 5-HT_{2A}-Rezeptoren, so dass eine direkte Beeinflussung via Serotonin der Mastzelle möglich ist [Yoder et al. 1996, 1997]. Proteasen der Mastzelle können ferner Myelin degradieren, jedoch kann Myelin selbst degranulationsinduzierend wirken [Yoder et al. 1997].

Bindegewebsmastzellen findet man in peripheren Nerven auch während der Regeneration [Olsson 1968]. Mastzellen üben überdies trophische Einflüsse auf Neurone aus: Sie enthalten NGF und Proteoglykane wie Heparin, denen eine Beeinflussung des Wachstums und der Wachstumsrichtung von Axonen zugeschrieben wird [Damon et al. 1988]. Vom Neurotransmitter Serotonin ist eine Beeinflussung des Wachstums des Axonhügels bekannt [Blennerhassett et al. 1991].

1.6 Serotonin und das serotonerge System

1.6.1 Synthese und Abbau von Serotonin

Die Synthese von Serotonin ähnelt der von Katecholaminen. Als Ausgangssubstrat dient die essenzielle Aminosäure L-Tryptophan [Frazer und Hensler 1994]. Serotoninproduzierende Zellen nehmen L-Tryptophan aus dem Blut direkt auf; ins Gehirn wird L-Tryptophan über ein Transportsystem, das es mit den verzweigtkettigen Aminosäuren sowie Phenylalanin und Tyrosin teilt, eingeschleust [Frazer und Hensler 1994]. L-Tryptophan wird mit Hilfe der zytoplasmatischen Tryptophanhydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) am Indolring hydroxyliert [Frazer und Hensler 1994; Starke 2001] (s. Abb.

hirn und den Hypothalamus sowie peripher auf einige enterische Nervenzellen und wirkt dort als Neurotransmitter [Frazer und Hensler 1994; Furness 2000; Galligan et al. 2000].

Aufgrund ihrer mannigfaltigen Projektionen und der Rezeptorvielfalt der Zielstrukturen haben serotonerge Neurone eine Vielzahl von Wirkungen (s. Tab. 1.4); sie sollen zur Regelung von Stimmung, Schlaf-Wach-Rhythmus, der Schmerzwahrnehmung, der Nahrungsaufnahme, des Blutdrucks und der Körpertemperatur beitragen [Frazer und Hensler 1994; Göthert und Starke 2001; Starke 2001].

Bislang sind mindestens 15 verschiedene Typen von Serotoninrezeptoren bekannt [Frazer und Hensler 1994; Göthert und Starke 2001]. Sie gliedern sich in die Typen 5-HT₁ bis 5-HT₇, die weitere Subtypen (z.B. 5-HT_{1A}) beinhalten [Mutschler 1997]. Es existieren ein ionotroper (5-HT₃-Rezeptor) und einige G-Protein-gekoppelte, metabotrope Serotoninrezeptoren [Starke 2001]. Man findet diese an Neuronen, Gliazellen, glatter Muskulatur, Endothel- und Epithelzellen sowie an Thrombozyten (s. Tab. 1.4).

Als ionotroper Rezeptor öffnet der 5-HT₃-Rezeptor bei Ligandenbindung einen Na⁺- und K⁺-Ionenkanal, wodurch die Zellmembran depolarisiert wird [Derkach et al. 1989; Peroutka et al. 1990; Tyers 1990; Starke 2001]. Es kommt rasch zur Exzitation des betreffenden Neurons [Derkach et al. 1989; Tyers 1990], wodurch weitere Neurotransmitter (z. B. Acetylcholin, SP) liberiert werden [Mutschler 1997]. Hingegen läuft die Signaltransduktion bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vergleichsweise langsam ab [Frazer und Hensler 1994]. 5-HT₃-Rezeptoren sind weit im zentralen und peripheren Nervensystem verbreitet; man findet sie u.a. in der Area postrema (Breachzentrum), im Nucleus tractus solitarii sowie an afferenten Nervenendigungen des Gastrointestinaltrakts [Peroutka et al. 1990; Tyers 1990; Frazer und Hensler 1994]. Alle 5-HT₁-Rezeptoren hemmen als Gemeinsamkeit über ein G_i-Protein die Adenylatzyklase [Peroutka et al. 1990]. Serotoninrezeptoren des Typs 2 stimulieren bei Aktivierung die phosphatidylinositspezifische Phospholipase C [Peroutka et al. 1990]; über diese Rezeptoren werden bei Säugetieren neurologische, psychologische und zirkulatorische Effekte hervorgerufen [Leysen und Pauwels 1990]. 5-HT_{2A}-Rezeptoren bringen die glatte Muskulatur von Gefäßen zur Kontraktion [Frazer und Hensler 1994]. Sie sind in der Peripherie ausschließlich postsynaptisch lokalisiert; ihre Stimulation bewirkt immer exzitatorische Effekte [Frazer und Hensler 1994; Mutschler 1997]. Die Endothelzellen von Blutgefäßen des Gehirns und der Meningen besitzen 5-HT_{2B}-Rezeptoren, deren Aktivierung zur Freisetzung von NO führt; im trigemino-vaskulären System soll die 5-HT-induzierte Freisetzung von NO bei der Migräneentstehung beteiligt sein [Göthert und Starke 2001].

5-HT₄-Rezeptoren stimulieren über ein G_s-Protein die Adenylatzyklase und kommen an der Präsynapse cholinergischer Neurone des enterischen Nervensystems vor [Göthert und Starke 2001; Starke 2001].

Serotoninrezeptor	Signaltransduktion	Vorkommen und Wirkung	Agonisten und Antagonisten
5-HT _{1A}	G _i -Protein: Inhibition der Adenylatzyklase	1) Hemmung von 5-HT-Neuronen der Raphékerne (somatodendritische 5-HT-Autorezeptoren) 2) Anxiolyse, Blutdrucksenkung	Buspiron, Urapidil, Lisurid, <i>Pizotifen</i>
5-HT _{1B}		1) Hemmung der 5-HT-Freisetzung im ZNS (präsynaptische 5-HT-Autorezeptoren) 2) Vasokonstriktion best. Gefäße: z.B. Koronararterien, wahrscheinlich auch Meningealgefäße	Triptane, z.B. Sumatriptan, <i>Pizotifen</i>
5-HT _{1D}		1) Hemmung der Freisetzung von Neuropeptiden aus sens. Nervenendigungen in Meningealgefäße 2) Hemmung der Noradrenalinfreisetzung aus symp. Nerven (präsynaptische 5-HT-Heterorezeptoren)	Triptane, z.B. Sumatriptan, <i>Pizotifen</i>
5-HT _{2A}	G _q -Protein: Stimulation der Phospholipase C	1) Kontraktion der glatten Magen-Darm-Muskulatur 2) Vasokonstriktion 3) Förderung der Thrombozytenaktivierung 4) Psychotrope Wirkungen	<i>Ketanserin, Risperidon, Pizotifen, Lisurid, Methysergid, Cyproheptadin</i>
5-HT _{2B}		Freisetzung von NO aus dem Endothel	<i>Pizotifen, Lisurid, Methysergid, Cyproheptadin</i>
5-HT ₃	(liganden-gesteuerter Ionenkanal)	1) Stimulation vagaler Afferenzen aus dem Herzen und Auslösung des Bezold-Jarisch-Reflexes 2) Stimulation der Acetylcholinfreisetzung im Gastrointestinaltrakt 3) Auslösung von Nausea und Emesis 4) Stimulation der Cholezystokininfreisetzung aus Neuronen des ZNS (→ Emotionsbeeinflussung)	<i>Ondansetron; Metoclopramid</i>
5-HT ₄	G _s -Protein: Stimulation der Adenylatzyklase	1) Stimulation der Acetylcholinfreisetzung im Gastrointestinaltrakt mit Motilitätssteigerung 2) Positiv inotroper und chronotroper Effekt	Cisaprid, Metoclopramid

Tab. 1.4: Übersicht über Serotoninrezeptoren mit dem Mechanismus ihrer Signaltransduktion, einigen Wirkungen und Möglichkeiten pharmakologischer Beeinflussung [nach Peroutka et al. 1990; Tyers 1990; Frazer und Hensler 1994; Mutschler 1997; Göthert und Starke 2001].

1.6.3 Serotonin und Serotoninrezeptoren des peripheren Nerven

Mastzellen stellen im wesentlichen den Serotoninpool des peripheren Nerven. Das im N. ischiadicus vorkommende Serotonin wird von Mastzellen des Bindegewebstyps produziert und gespeichert [Olsson 1968]. Im peripheren Nervensystem tragen Gliazellen und Blutgefäße Serotoninrezeptoren. Schwannsche Zellen des N. ischiadicus der Ratte exprimieren in Zellkultur den 5-HT_{2A}-Rezeptor, der sich im Zytoplasma und an der Zellmembran detektieren lässt [Yoder et al. 1996, 1997]. Die Immunhistochemie mit einem Antikörper, der die Rezeptorsubtypen 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} und 5-HT_{2C} erkennt, zeigt, dass die Schwannschen Zellen sowohl bei gesunden als auch bei regenerierenden, jedoch nicht bei degenerierenden Nerven diese Serotoninrezeptoren tragen, was eine axonale Beeinflussung der Rezeptorexpression der Schwannschen Zellen impliziert [Yoder et al. 1997].

1.6.4 Serotoninrezeptoren des Sympathikus

Im Ganglion cervicale superius der Ratte lässt sich die mRNA folgender Serotoninrezeptortypen nachweisen: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₆ und 5-HT₇ [Pierce et al. 1996]. Die lumbalen sympathischen Ganglien zeigen bis auf das Fehlen des 5-HT₆-Rezeptors eine gleiche Ausstattung mit Serotoninrezeptoren wie das Ganglion cervicale superius [Pierce et al. 1996]; das sensible Ganglion spinale enthält zusätzlich die mRNA der Serotoninrezeptoren 5-HT_{1F}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ und 5-HT_{5A} [Pierce et al. 1996; Wu et al. 2001].

Mittels pharmakologischer Untersuchungen lassen sich drei verschiedene Serotoninrezeptortypen im Ganglion cervicale superius des Meerschweinchens identifizieren: Geringe Konzentrationen von Serotonin aktivieren 5-HT_{2A}-Rezeptoren und höhere Konzentrationen ebenso 5-HT₃-Rezeptoren sowie einen den 5-HT₂-Rezeptoren homologen, möglicherweise aber neuen, unklassifizierten Serotoninrezeptor [Watkins und Newberry 1996]. Immunhistochemisch lässt sich der 5-HT_{5A}-Rezeptor in Neuronen des Ganglion cervicale superius detektieren, ebenso 5-HT_{5A}-Rezeptor-DNA [Wang et al. 2000].

1.7 Histamin und das histaminerge System

1.7.1 Synthese und Abbau von Histamin

Histamin entsteht aus der essenziellen Aminosäure L-Histidin [Green 1994]. Das Enzym Histidindecarboxylase decarboxyliert pyridoxalphosphatabhängig die Säuregruppe von L-Histidin, worauf Histamin entsteht (vgl. Abb. 1.4) [Green 1994; Göthert und Schlicker 2001].

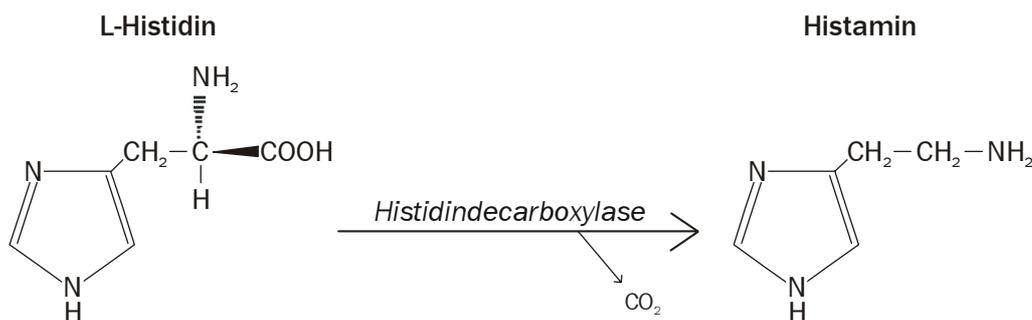


Abb. 1.4: Ablauf der enzymatischen Synthese von Histamin aus der Aminosäure L-Histidin. Die Histidindecarboxylase katalysiert die Decarboxylierung von L-Histidin zu Histamin unter Abspaltung von Kohlendioxid. Dabei erlischt das Chiralitätszentrum am C-Atom der Seitenkette.

Ein hochaffiner Carrier zur zellulären Aufnahme für Histamin existiert nicht [Green 1994; Starke 2001]. Der Abbau von Histamin ist ein vielstufiger Prozess; er beginnt entweder mit oxidativer Desaminierung durch das Enzym „Diaminoxidase“ oder mit einer Methylierung des Stickstoffs [Wasserman 1979;

Green 1994]. Verschiedene Abbauprodukte des Histamins wie N^{tele}-methyl-imidazolylelessigsäure oder Imidazolacetat finden sich bei pathologischen Prozessen gehäuft im Urin, wie beispielsweise bei akuten allergischen Erkrankungen [Göthert und Schlicker 2001].

1.7.2 Das Vorkommen von Histamin im Organismus

Gewebemastzellen beinhalten den größten Teil des körpereigenen Histaminpools, aber auch die im Blut vorkommenden basophilen Granulozyten und Thrombozyten enthalten Histamin [Green 1994; Göthert und Schlicker 2001]. Wird eine bestimmte Schwellenkonzentration von Histamin im Blutplasma überschritten, so kommt es mit zunehmender Histaminkonzentration zur Magensaftsekretion, zur Zunahme der Herzfrequenz, zur Senkung vor allem des diastolischen Blutdrucks und zum Bronchospasmus [Göthert und Schlicker 2001]. In den meisten Geweben ist der Histamingehalt zur Zahl der Mastzellen proportional [Green 1994]. Ferner übertrifft wie beim Serotonin außerneuronales Histamin das neuronale an Menge [Green 1994].

1.7.3 Histamin und Histaminrezeptoren

Es existieren drei heptahelikale, G-Protein-gekoppelte Histaminrezeptoren, H₁, H₂ und H₃ [Green 1994; Hill et al. 1997; Göthert und Schlicker 2001]. H₁-Rezeptoren dominieren in der Haut und in der glatten Muskulatur, H₂-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge [Göthert und Schlicker 2001].

Eine Bindung von Histamin an H₁-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C; die entstehenden second-messenger IP₃ (Inosit-1, 4, 5-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerin) setzen Kalzium frei und aktivieren Proteinkinasen und die Phospholipase A₂ [Green 1994; Hill et al. 1997; Göthert und Schlicker 2001]. Ein Anstieg der Kalziumkonzentration in der Endothelzelle aktiviert die NO-Synthase; das gebildete NO diffundiert durch die Zellmembranen in die glatte Gefäßmuskulatur und bewirkt eine Vasodilatation mit endothelialer Permeabilitätserhöhung [Göthert und Schlicker 2001].

Die Stimulation von H₂-Rezeptoren aktiviert die Adenylatzyklase; der entstehende second-messenger cAMP wirkt auf Proteinkinasen, die die Information durch Phosphorylierung an verschiedene Proteine weiterleiten [Green 1994; Hill et al. 1997]. Eine Aktivierung von H₂-Autorezeptoren an Mastzellen inhibiert deren eigene Histaminfreisetzung [Göthert und Schlicker 2001].

Im Gegensatz zu H₂-Rezeptoren wird bei einer Stimulation von H₃-Rezeptoren die Adenylatzyklase inhibiert [Hill et al. 1997; Göthert und Schlicker 2001]. H₃-Rezeptoren kommen beispielsweise an Präsynapsen histaminerner Neurone im Gehirn vor, die im Sinne einer negativen Rückkopplung ihre eigene Histaminfreisetzung hemmen [Göthert und Schlicker 2001].

Seit neuestem ist die Existenz eines durch Histamin als Ligand gesteuerten Chloridkanals im visuellen System von *Drosophila melanogaster* bekannt [Gisselmann et al. 2002; Zheng et al. 2002]. Histamin hat hierbei die Funktion eines inhibitorischen Neurotransmitters [Gisselmann et al. 2002; Zheng et al. 2002].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Es wurden 12 Ratten der Zuchtlinie „Wistar-Unilever“ der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borken, BRD, für zwei Versuchsreihen verwendet, d.h. für jede Versuchsreihe 6 Ratten. Die Tiere waren weibliche Albinos mit einem Durchschnittsgewicht von 250 g im Alter von 7 Wochen.

2.1.2 Geräte

Mikrotom

Kryostat „CM 1900“ der Fa. Leica, Bensheim, BRD.

Mikroskop

Forschungsmikroskop BX 60F der Fa. Olympus, Hamburg, BRD, mit Fluoreszenzeinrichtung in Auflichterregung, Fotosystem PM 20 und Schwarz-Weiss-Digitalkamera mit angeschlossenem PC zur Bildvermessung und -verarbeitung.

Objektmikrometer

Positiver Objektmikrometer mit 2 mm Skalenlänge und 10 µm Intervall der Fa. Leitz, Wetzlar, BRD.

Filme

Zur Anwendung kamen der Schwarzweissfilm TMY 400 und der Diafilm Ektachrome 64T der Fa. Kodak.

Programme

Die Bearbeitung der Digitalbilder erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 5.0, die Vermessung mit Hilfe von Scion Image, die rechnerische Auswertung aller Daten mit Microsoft Excel 97 und die statistische Testung von Hypothesen mit SPSS 10.0.

2.1.3 Primärreagenzien

Antigen Immunogen	Antikörper	Wirts- spezies	Arbeitsver- dünnung	Hersteller	Literatur
Glut-1 Synthetisches Peptid, das dem C-Terminus des Glut-1 der Ratte entspricht	anti-Glut-1 polyklonal IgG	Kaninchen	1 : 1000	Fa. Chemicon Internat., Temecula, CA, USA	
Protein gene product 9.5 PGP 9.5 des menschlichen Gehirns	anti-PGP 9.5 monoklonal, Klon 31A3 IgG	Maus	1 : 400	Fa. Biotrend, Köln, BRD	
RECA-1 Stromazellen aus Lymphknoten der Ratte	anti-RECA-1 monoklonal, Klon HIS52 IgG 1	Maus	1 : 40	Fa. Serotec Ltd., Oxford, UK	Duijvestijn et al. 1992
Serotonin 5-Hydroxytryptaminhydrochlorid	anti-Serotonin monoklonal, Klon 5HT-H209 IgG 1, kappa	Maus	1 : 40	Fa. DAKO, Hamburg, BRD	
Serotonin-Rezeptor Typ 2A Synthetisches Peptid, das den Aminosäuren 22-41 des 5-HT _{2A} -Rezeptors der Ratte entspricht	anti-5-HT_{2A} polyklonal IgG	Kaninchen	1 : 200	Fa. Dianova, Hamburg, BRD	
Serotonin-Rezeptor Typ 3 Synthetisches Peptid, das den Aminosäuren 444-457 des 5-HT ₃ -Rezeptors der Ratte entspricht	anti-5-HT₃ polyklonal IgG	Kaninchen	1 : 200	Fa. Dianova, Hamburg, BRD	

Antigen	Antikörper	Wirtsspezies	Arbeitsverdünnung	Hersteller	Literatur
Synaptophysin Synaptophysin aus einer Vesikelfraktion des Rinderhirns	anti-Synaptophysin monoklonal, Klon SY-38 IgG 1	Maus	1 : 200	Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD	Wiedenmann et al. (1985)
Vesikulärer Acetylcholin-Transporter (VACHT) synthetisches Peptid (15-20 Aminosäuren) des vesikulären ACh-Transporters	anti-VACHT polyklonal IgG	Ziege	1 : 500	Fa. Biotrend, Köln, BRD	
Vimentin Vimentin aus der Augenlinse des Schweins	anti-Vimentin monoklonal, Klon V9 IgG 1	Maus	1 : 200	Fa. Sigma, Deisenhofen BRD	

Tab. 2.1: Aufstellung der primären Antikörper

2.1.4 Sekundärreagenzien

Sekundärantikörper	Konjugat	Arbeitsverdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen-IgG von der Ziege	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)	1 : 400	Fa. Organon Teknika, Eppelheim, BRD
anti-Kaninchen-IgG vom Esel	Indocarbocyanin (Cy-3)	1 : 800	Fa. Dianova, Hamburg, BRD
anti-Maus-IgG vom Esel	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)	1 : 50	Fa. Dianova, Hamburg, BRD
anti-Maus-IgG von der Ziege	Indocarbocyanin (Cy-3)	1 : 1000	Fa. Dianova, Hamburg, BRD
anti-Maus-IgG vom Esel	7-Amino-4-methylcoumarinacetat (AMCA)	1 : 50	Fa. Dianova, Hamburg, BRD
anti-Ziege-IgG von der Maus	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)	1 : 800	Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA

Tab. 2.2: Aufstellung der sekundären Antikörper

2.1.5 Kontrollpeptide

Zur Spezifitätskontrolle der Primärantikörper gegen die Serotoninrezeptoren der Typen 2A und 3 wurden folgende Kontrollpeptide eingesetzt:

Spezifitätskontrolle für	Kontrollpeptid	Konzentration	Hersteller
5-HT _{2A} -Rezeptor-Antikörper	Synthetisches Peptid, das den Aminosäuren 22-41 des 5-HT _{2A} -Rezeptors der Ratte entspricht	5 µg/ml	Fa. Dianova, Hamburg, BRD
5-HT ₃ -Rezeptor-Antikörper	Synthetisches Peptid, das den Aminosäuren 444-457 des 5-HT ₃ -Rezeptors der Ratte entspricht	5 µg/ml	Fa. Dianova, Hamburg, BRD

Tab. 2.3: Aufstellung der verwendeten Kontrollpeptide.

2.1.6 Sonstige Reagenzien

- Sevorane (Wirkstoff: Sevofluran) der Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden, BRD
- Tissue-Tek der Fa. Vogel, Giessen, BRD
- Normales Schweineserum (NSS), geholt vom Schlachthof Giessen, BRD
- Tween 20 der Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
- Polyvinylpyrrolidon der Fa. Roth, Karlsruhe, BRD
- Heparin der Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whyllen, BRD

Alle weiteren, nicht separat aufgeführten Reagenzien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, BRD, bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebe

2.2.1.1 Gewebegewinnung

Die Versuchstiere wurden durch das Inhalationsanästhetikum Sevofluran betäubt und anschließend mit einer Vorspüllösung nach Forssmann et al. [1977] und einer Fixationslösung nach Zamboni et al. [1967] transkardial perfundiert. Der Tod erfolgte durch Entbluten.

2.2.1.2 Behandlung des Gewebes

Nach der Fixierung wurden jeder Ratte beide Ganglia cervicalia superiora und beide Ganglia stellata entnommen. Für Untersuchungen zur Positivkontrolle wurden zusätzlich einem Tier Ileum, Milz und das Gehirn entnommen. Das Gewebe wurde zum Waschen unverzüglich in 0,2 M Phosphatpuffer überführt, der alle ein bis zwei Stunden bis zur vollständigen Entfärbung des Gewebes gewechselt wurde. Somit wurde die Fixationslösung weitgehend aus dem Gewebe eliminiert, die die spätere Immunhistochemie

stören könnte. Zur Kryoprotektion erfolgte eine Inkubation der Ganglien in 18%-saccharosehaltigen 0,1M Phosphatpuffer über Nacht.

Das Einbetten des Gewebes geschah auf folgende Weise: Es wurde ein Tropfen Tissue-Tek-Medium auf Trägerpapier gegeben, dieses in flüssigem Stickstoff (-196 °C) kurz gefroren, in dem noch weichen Bereich des Mediums das Ganglion eingebettet und sofort mit weiterem Tissue-Tek überschichtet. Hiernach wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung des Gewebes bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.3 Herstellen der Gewebeschnitte

Jedes Ganglion wurde am Kryostaten bei -24 °C in 12 µm Dicke komplett in Serie quer geschnitten und auf chromgelatinierte Objektträger aufgezogen. Durch die Chromgelatinierung wurde ein Abschwimmen des Gewebes bei den späteren Waschvorgängen verhindert. Für Demonstrationszwecke wurden außerhalb der beiden Versuchsreihen von weiteren Ganglien Längsschnitte angefertigt.

2.2.2 Immunfluoreszenz

2.2.2.1 Aufbau der Versuchsreihe A

Mit Hilfe der Primärantikörper gegen Serotonin, GluT-1 und RECA-1 lassen sich Mastzellen, Gefäße und Perineurium sowie selektiv die Gefäße darstellen. Mit jeweils sechs Ganglia cervicalia superiora und Ganglia stellata wurden die folgenden Immunfluoreszenzen durchgeführt:

1. Doppelmarkierung von Serotonin und GluT-1
2. Doppelmarkierung von Serotonin und RECA-1

Die Ausführung der ersten Kombination erfolgte mit Primärantikörpern verschiedener Wirtsspezies; hierdurch war ein simultanes Markierungsverfahren beider Antigene möglich. Die Primärantikörper der zweiten Kombination entstammen gleicher Wirtsspezies; bei ihrer Anwendung in der Immunhistochemie wurde sukzessive verfahren.

Von jedem Ganglion ließen sich insgesamt 96 Schnitte anfertigen, die auf Objektträgern zu jeweils 4 Schnitten aufgezogen wurden. Nach fortlaufender Schnittposition im jeweiligen Ganglion wurden den Objektträgern alternierend die beiden oben genannten Doppelmarkierungen zugewiesen. Es waren somit 24 Objektträger pro Ganglion vorhanden, davon jeweils 12 mit Darstellung von Serotonin und GluT-1 sowie Markierung von Serotonin und RECA-1. Da insgesamt 6 Ganglia cervicalia superiora und 6 Ganglia stellata verwendet wurden, waren pro Markierung 144 Objektträger mit 576 Schnitten vorhanden, das sind 12 Objektträger mit 48 Schnitten pro Ganglion und Markierung.

Es war somit sichergestellt, dass Schnitte unterschiedlicher Höhenlokalisierung innerhalb der Ganglien gleichmäßig auf die beiden Doppelmarkierungen verteilt wurden und umgekehrt eine Analyse der Befunde nach der Position innerhalb des Ganglions möglich war.

Als Ergänzung wurde an Präparaten außerhalb der beiden genannten Versuchsreihen eine

3. Doppelmarkierung von RECA-1 und GluT-1

durchgeführt; bei der Anwendung der Sekundärantikörper konnte hierbei simultan verfahren werden, da die beiden primären Antikörper verschiedener Wirtsspezies entstammen.

Für die Belichtung des Diafilmes und für Schwarzweißaufnahmen wurden die Doppelmarkierungen Nr.

1. und 3. mit dem Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörper gegen Maus-IgG und dem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-IgG

sowie die Doppelmarkierung Nr.

2. mit dem Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörper gegen Maus-IgG und dem FITC-konjugierten Antikörper gegen Maus-IgG

markiert.

2.2.2.2 Aufbau der Versuchsreihe B

Zur simultanen Darstellung von 5-HT₃-Rezeptoren und Neuronen bzw. Synapsen sowie von 5-HT_{2A}-Rezeptoren und Gefäßen wurden mit sechs Ganglia cervicalia superiora und Ganglia stellata jeweils folgende Immunfluoreszenzen durchgeführt:

1. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und PGP 9.5
2. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und VAcHT
3. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und Synaptophysin
4. Doppelmarkierung von 5-HT_{2A}-Rezeptor und RECA-1

Jede Doppelmarkierung wurde mit sechs Objektträgern zu je vier Schnitten durchgeführt, so dass ein einzelnes Ganglion 24 Schnitte je Doppelmarkierung und insgesamt 96 Schnitte ergab. Die Zuteilung eines Objektträgers zu einer bestimmten Markierung erfolgte folgendermaßen: Nach fortlaufender Schnittposition wurde dem ersten Träger Doppelmarkierung Nr. 1, dem zweiten Doppelmarkierung Nr. 2 u.s.w. zugewiesen; der fünfte Objektträger erhielt wieder Markierung Nr. 1. Diese Verteilung erfolgte so lange, bis jeweils sechs Präparate dieselbe Doppelmarkierung erhalten hatten. Hierdurch war sichergestellt, dass Schnitte unterschiedlicher Höhenlokalisierung innerhalb der Ganglien gleichmäßig auf die vier Doppelmarkierungen verteilt waren und umgekehrt eine Analyse der Befunde getrennt nach der longitudinalen Ganglienachse möglich wurde.

Ergänzend wurde an Präparaten außerhalb der oben genannten Versuchsreihe eine weitere

5. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und Vimentin

ausgeführt, d.h. der 5-HT₃-Rezeptor simultan mit den Satellitenzellen dargestellt.

Für die Aufnahme der Präparate mittels Digitalkamera und Schwarzweiß-Fotografie wurden die Doppelmarkierungen Nr. 1-3 mit dem Cy-3-konjugierten Sekundärantikörper gegen Kaninchen-IgG und dem

AMCA-konjugierten Antikörper gegen Maus-IgG dargestellt; für die Aufnahmen auf Diafilm wurden zusätzliche Präparate hergestellt, bei denen statt des AMCA-konjugierten ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt wurde.

Für die Belichtung des Diafilmes und Schwarzweißaufnahmen von Markierung Nr. 4 und 5 wurde mit dem Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörper gegen Kaninchen-IgG und dem FITC-konjugierten Antikörper gegen Maus-IgG markiert.

2.2.2.3 Allgemeine Versuchsvorbereitung

Die Präparate wurden nach dem Schneiden für eine Stunde an der Luft getrocknet, danach mittels eines Fettstifts der Gewebeschnitt mit kleinem Radius eingekreist. Nach diesen Vorbereitungen wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für eine Stunde mit Präinkubationslösung abgesättigt.

2.2.2.4 Ausführung der Doppelimmunfluoreszenz der Versuchsreihe A

A) Simultanes Verfahren: Doppelmarkierung von Serotonin und GluT-1 bzw. RECA-1 und GluT-1

Die beiden primären Antikörper wurden in PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt und 50 µl dieser Lösung pro Objektträger aufgetragen. Nachdem 24 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert worden war, erfolgte eine zweimalige Waschung der Präparate für jeweils 10 Minuten in PBS. Danach wurden die beiden sekundären Antikörper in PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt und wiederum 50 µl dieser Lösung auf die Schnitte eines Objektträgers verteilt. Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde in der feuchten Kammer mit den sekundären Antikörpern. Nach erneutem zweimaligen Waschen für jeweils 10 Minuten in PBS wurden die Präparate mit carbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckt.

B) Sukzessives Verfahren: Doppelmarkierung von Serotonin und RECA-1

Erste Immunfluoreszenz

Der erste primäre Antikörper gegen Serotonin wurde durch PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt und 50 µl dieser Lösung pro Objektträger aufgetragen. Nachdem 24 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert worden war, erfolgte eine zweimalige Waschung der Präparate für jeweils 5 Minuten in PBS. Danach wurde der erste sekundäre, Cy-3-konjugierte Antikörper gegen Maus-IgG in PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt und wiederum 50 µl dieser Lösung pro Objektträger aufgetragen. Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde in der feuchten Kammer. Darauf wurden die Präparate zweimal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen.

Zweite Immunfluoreszenz

Danach wurde der zweite primäre Antikörper gegen RECA-1 in PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt und 50 µl dieser Lösung pro Objektträger aufgetragen. Nach 24 Stunden Inkubation in der feuchten Kammer erfolgte eine zweimalige Waschung der Präparate für jeweils 5 Minuten in PBS. Danach wurde der zweite sekundäre, FITC-gekoppelte Antikörper gegen Maus-IgG in PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt und wiederum 50 µl dieser Lösung pro Objektträger aufgetragen. Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde in der feuchten Kammer. Nach einem erneuten, zweimaligen Waschen für jeweils 5 Minuten in PBS wurden die Präparate mit carbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckt.

2.2.2.5 Ausführung der Doppelimmunfluoreszenz der Versuchsreihe B

Das folgende Verfahren wurde für die Ausführung aller Doppelimmunfluoreszenzen gleichartig angewandt: Die beiden primären Antikörper wurden mit PBS mit doppelter Salzkonzentration versetzt und gemischt. Von dieser Lösung wurden 50 µl auf je einen Objektträger aufgetragen. Danach wurde für 24 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert. Die anschließende Waschung der Präparate erfolgte für zweimal zehn Minuten in PBS. Danach wurden die beiden sekundären Antikörper mit PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt und analog den beiden primären auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer Inkubation von einer Stunde in der feuchten Kammer erfolgte abermals eine zweimalige Waschung der Objekte in PBS von jeweils 10 Minuten. Die Präparate wurden mit carbonatgepuffertem Glycerol (pH=8,6) eingedeckt.

2.2.3 Kontrolle

2.2.3.1 Positivkontrolle

Zur Positivkontrolle der Versuchsreihe A wurden Gewebeschnitte von Ileum und Milz der Ratte angefertigt und mit dem Serotonin-Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper markierte sensitiv die in diesen Geweben vorkommenden Mastzellen.

Zur Positivkontrolle der Versuchsreihe B wurden Gewebeschnitte vom Gehirn der Ratte mit Hippocampusregion angefertigt und mit den beiden Serotoninrezeptor-Antikörpern inkubiert. Diese markierten sensitiv die dort reichlich vorkommenden Serotoninrezeptoren der Typen 2A und 3.

2.2.3.2 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle diente bei jeder Doppelimmunfluoreszenz ein Objektträger mit vier Ganglienschnitten, der lediglich mit den Sekundärantikörpern inkubiert wurde. Bei den verwendeten Sekundärantikörpern waren keine unspezifischen Bindungen erkennbar.

Weiterhin wurde die spezifische Bindung der beiden Antikörper gegen den 5-HT_{2A}-Rezeptor und den 5-HT₃-Rezeptor durch Präabsorption mit dem jeweiligen Antigen getestet. Hierzu wurde der Antikörper gegen den 5-HT_{2A}-Rezeptor bei einer Verdünnung von 1 : 200 durch das 5-HT_{2A}-Rezeptor-Kontrollpeptid (Konzentration von 5 µg/ml) und der Antikörper gegen den 5-HT₃-Rezeptor bei einer Verdünnung von 1 : 200 durch das 5-HT₃-Rezeptor-Kontrollpeptid (Konzentration von 5 µg/ml) präabsorbiert. Die Antikörper gegen die beiden Serotoninrezeptoren markierten ihre Zielstrukturen spezifisch; nach der Präabsorption mit den jeweiligen Antigenen waren keine Bindungen der Antikörper an den Schnitt mehr erkennbar.

2.2.4 Mikroskopische Dokumentation

2.2.4.1 Verwendete Filterkombinationen

Fluorochrom	Farbe	Erregerfilter	Dichroischer Spiegel	Sperrfilter
AMCA	blau	360-370 nm	400 nm	420-460 nm
FITC	grün	470-490 nm	455 nm	515-550 nm
Cy-3	orange	525-560 nm	555 nm	570-650 nm
Texas-Rot	rot	545-580 nm	600 nm	>610 nm

Tab. 2.4: Aufstellung der verwendeten Filterkombinationen

2.2.4.2 Aufnahme der Präparate der Versuchsreihe A

A) Anfertigung der Papierbilder

Von den Präparaten der Versuchsreihen

1. Doppelmarkierung von Serotonin und GluT-1
2. Doppelmarkierung von Serotonin und RECA-1

wurden Aufnahmen auf Scharzweißfilm angefertigt. Kriterium zur Anfertigung einer Aufnahme war das Vorhandensein einer serotoninpositiven Mastzelle, auf die bei 40facher Objektivvergrößerung die Aufnahme hin zentriert wurde. Als Fluorochrome dienten Cy-3 für die Markierung von Serotonin und FITC für die Darstellung von GluT-1 und RECA-1. Die Position aller Aufnahmen bezüglich der longitudinalen Ganglienachse wurde dokumentiert.

Von Präparaten der Doppelmarkierung von RECA-1 und GluT-1 wurden an repräsentativen Stellen Bildpaare in verschiedenen Vergrößerungen angefertigt.

B) Anfertigung der Diapositive

Zusätzlich wurden Diapositive von einigen Präparaten in Doppelbelichtung angefertigt. Es wurde für die Belichtung des Filmes durch den Fluorochrom FITC die korrekte Filterkombination gewählt, für die Be-

lichtung mit Cy-3 jedoch der Texas-Rot-Filter, um ein reines Grün und Rot zu erhalten. Eine Farbmischung zu gleichen Anteilen liefert somit die Farbe Gelb.

C) Registrierung der Mastzellen

Die Lage aller Mastzellen bezüglich der longitudinalen Ganglienachse wurde protokolliert.

2.2.4.3 Aufnahme der Präparate der Versuchsreihe B

A) Anfertigung der Digitalaufnahmen

Folgende Präparate wurden mittels Digitalkamera aufgenommen:

1. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und PGP 9.5
2. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und VACHT
3. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und Synaptophysin

Als Fluorochrom für die Markierung des Serotonin-Rezeptors diente Cy-3, für die Markierung von PGP 9.5, VACHT und Synaptophysin der Fluoreszenzfarbstoff AMCA. Es wurden jeweils Bildpaare mit dem 40x-Objektiv angefertigt. Pro Ganglion und Doppelmarkierung wurden sechs Aufnahmen, von denen sich jeweils zwei auf jeden Pol und das Zentrum des Ganglions verteilen, an zufällig ausgewählten Stellen des jeweiligen Schnittes angefertigt.

B) Anfertigung der Papierbilder

Die Dokumentation der mittels

4. Doppelmarkierung von 5-HT_{2A}-Rezeptor und RECA-1

angefertigten Präparate erfolgte durch Aufnahme auf Schwarzweiß-Film und Anfertigung von Abzügen. Als Fluorochrome dienten Cy-3 für die Markierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors und FITC für die Darstellung von RECA-1. Pro Ganglion und Doppelmarkierung wurden ebenso sechs Aufnahmen, von denen sich jeweils zwei auf jeden Pol und das Zentrum des Ganglions verteilen, an beliebigen Stellen des jeweiligen Schnittes angefertigt.

C) Anfertigung der Diapositive

Von repräsentativen Stellen aller Präparate wurden zusätzlich Diapositive in Doppelbelichtung angefertigt, ebenso wurden Aufnahmen der

5. Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und Vimentin

auf diese Weise angefertigt. Zu diesem Zweck wurden weitere Präparate der genannten Doppelmarkierungen hergestellt, um den Fluorochrom AMCA durch das hierfür aus aufnahmetechnischen Gründen

besser geeignete FITC zu ersetzen. Es wurde für die Belichtung mit FITC die korrekte Filterkombination gewählt, für Cy-3 jedoch der Texas-Rot-Filter, um ein reines Grün und Rot zu erhalten; so erscheint eine Farbmischung zu gleichen Teilen in reinem Gelb.

2.2.4.4 Montage eines Referenzmaßstabs

A) Montage des Referenzmaßstabs auf die Mikrofotografien

Es ist zur weiteren Auswertung der Bilder notwendig, einen genauen Objektmikrometer zu montieren. Hierzu wurden Aufnahmen eines positiven Objektmikrometers der Firma Leitz, Wetzlar, in allen zur Anwendung kommenden Vergrößerungen angefertigt. Die auf Fotopapier abgezogenen Positive wurden digitalisiert und am Rechner ein entsprechender transparenter Maßstab erstellt. Bei der Anfertigung der Papierabzüge wurden die entsprechenden Maßstäbe im Kontaktverfahren [Martin 1977] mitbelichtet, und zwar unter dem Anpressdruck einer Führung, um geometrische Verzeichnungen zu vermeiden.

Der genannte Objektmikrometer wurde auch auf Dia aufgenommen, um für die Farbdiapositive und deren Abzüge einen Maßstab zu erhalten.

B) Montage des Referenzmaßstabs auf die Digitalbilder

Der positive Objektmikrometer der Firma Leitz, Wetzlar, wurde digitalisiert und diente im Programm Scion Image zur Kalibrierung für die halbautomatische Vermessung der Digitalbilder der Präparate. Sowohl die Digitalbilder als auch der Maßstab blieben während der Bearbeitung in Adobe Photoshop stets in der ursprünglichen Auflösung zum Ausschluss von Artefakten der elektronischen Verarbeitung erhalten.

2.2.5 Auswertung

2.2.5.1 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von Serotonin und GluT-1

A) Bildvermessung

Zur Auswertung kamen alle aufgenommenen Gewebeschnitte. Es wurde auf den Abzügen jeweils der geringste Abstand zwischen

- a) der serotoninpositiven Mastzelle und dem GluT-1-positiven Perineurium
- b) der serotoninpositiven Mastzelle und dem GluT-1-positiven Gefäß

gemessen. Messpunkte waren der äußere Umfang der Mastzelle und des Gefäßes. Als Referenz diente der jeweils auf den Abzug mitbelichtete Maßstab. Für die Messung a) wurden alle Mastzellen, für die Messung b) die Mastzellen mit maximal 70 µm Distanz zum nächsten GluT-1-positiven Gefäß registriert.

B) Quantitative Auswertung

Alle gemessenen Daten wurden in die Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97 eingegeben und dort in speziell programmierten Formularen weiterverarbeitet. Die gemessenen Abstände zwischen der Mastzelle und dem GluT-1-positiven Perineurium wurden in Klassen mit einem Intervall von 20 μm eingeteilt und die Häufigkeit der jeweiligen Abstände bestimmt. Weiterhin wurde die Lage der serotoninpositiven Mastzelle nach den Kriterien „innerhalb“ und „außerhalb“ des Ganglions beschrieben. Die gemessenen Abstände zwischen der Mastzelle und dem nächsten GluT-1-positiven Gefäß wurden in Klassen mit einem Intervall von 10 μm eingeteilt, in denen die Häufigkeit an Mastzellen einer jeweiligen Klasse registriert wurde.

Zur statistischen Auswertung wurden alle Daten in das Statistikprogramm SPSS 10.0 importiert .

Die gesamte Auswertung erfolgte getrennt nach Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum sowie nach Etagen der longitudinalen Ganglienachse, um die topographische Verteilung der Mastzellen und des GluT-1 erfassen zu können.

C) Nullhypothesen

Hintergrund: Es soll überprüft werden, ob zwischen den Mastzellen und dem Perineurium ein topographischer Bezug besteht, d.h. ob die Anzahl der Mastzellen in unmittelbarer Nähe des Perineuriums größer ist als in entfernteren Bereichen. Außerdem ist von Interesse, ob die in geringer Entfernung vom Perineurium gelegenen Mastzellen nach intra- und extraganglionär eine vergleichbare Verteilung aufweisen. Untersucht werden soll auch, ob in der Verteilung der Mastzellen im Bereich des Perineuriums ein Unterschied zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum besteht.

Es wurden die folgenden Nullhypothesen formuliert:

- Die Anzahl der Mastzellen in einem Abstand von maximal 20 μm zum Perineurium entstammt derselben Grundgesamtheit wie die Anzahl der Mastzellen, die jeweils zwischen 21 μm und 50 μm nach intra- und extraganglionär vom Perineurium entfernt liegen.
- Die Anzahl der intraganglionär gelegenen Mastzellen einer Distanz von 21 μm bis 50 μm vom Perineurium entstammt derselben Grundgesamtheit wie die Anzahl der extraganglionär gelegenen Mastzellen einer Distanz von 21 μm bis 50 μm vom Perineurium.
- Die Anzahl der Mastzellen in einem Abstand von maximal 20 μm zum Perineurium entstammt beim Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum derselben Grundgesamtheit; die Anzahlen der intra- und extraganglionär gelegenen Mastzellen, die eine Distanz von 21 μm bis 50 μm

vom Perineurium einnehmen, entstammt beim Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum jeweils derselben Grundgesamtheit.

2.2.5.2 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von Serotonin und RECA-1

A) Bildvermessung

Zur Auswertung kamen alle aufgenommenen Gewebeschnitte. Folgende Parameter wurden direkt auf den Abzügen vermessen:

- a) kürzester Abstand der RECA-1-positiven Gefäße untereinander
- b) kürzester Abstand zwischen der serotoninpositiven Mastzelle und dem nächsten RECA-1-positiven Gefäß
- c) Durchmesser des der serotoninpositiven Mastzelle nächstgelegenen RECA-1-positiven Gefäßes, sofern der Abstand zwischen Mastzelle und diesem Gefäß höchstens 20 μm beträgt
- d) Durchmesser der serotoninpositiven Mastzelle

Gemessen wurde jeweils vom äußeren Umfang von Mastzelle und Gefäß. Der jeweils auf die Abzüge mitbelichtete Maßstab diente als Referenz. Außerdem wurden die innerhalb und außerhalb des jeweiligen Ganglions liegenden Mastzellen registriert.

B) Quantitative Auswertung

Alle gemessenen Daten wurden in die Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97 eingegeben und dort in speziell programmierten Formularen weiterverarbeitet. Die gemessenen Abstände zwischen den RECA-1-positiven Gefäßen sowie zwischen der serotoninpositiven Mastzelle und dem RECA-1-positiven Gefäß wurden in Klassen mit einem Intervall von 5 μm eingeteilt und die Häufigkeit der jeweiligen Abstände bestimmt. Die Durchmesser der serotoninpositiven Mastzelle und des der Mastzelle nächstgelegenen, RECA-1-positiven Gefäßes wurden in Klassen mit einem Intervall von 5 μm eingeteilt, in denen die Häufigkeit der jeweiligen Durchmesser registriert wurde.

Aus den gemessenen Größen wurden rechnerisch ermittelt:

- a) Das Verhältnis des Abstands der Mastzelle zum RECA-1-positiven Gefäß zu dem Durchmesser der Mastzelle.
- b) Das Verhältnis des tatsächlichen Abstands zwischen Mastzelle und Gefäß zu dem maximal möglichen Abstand zwischen beiden.
- c) Das Verhältnis des tatsächlichen Abstands zwischen Mastzelle und Gefäß zu dem halbmaximalen Abstand zwischen beiden.

Da alle Messungen den Umfang der Mastzelle als Bezugspunkt hatten, musste für eine korrekte Berechnung der Punkte b) und c) der Durchmesser der Mastzelle berücksichtigt werden. Hierbei wurde vom durchschnittlichen Gefäßabstand der Durchmesser der Mastzelle subtrahiert und diese Differenz halbiert bzw. geviertelt, um den maximalen bzw. halbmaximalen Abstand zwischen dem jeweiligen äußeren Umfang der Mastzelle und des Gefäßes zu erhalten. Von der unter a) bis c) beschriebenen Auswertung wurden die extraganglionären Mastzellen ausgeschlossen.

Zur statistischen Auswertung und Testung von möglichen Zusammenhängen wurden alle Daten in das Statistikprogramm SPSS 10.0 importiert und dort weiterverarbeitet.

Die gesamte Auswertung erfolgte getrennt nach Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum und unter Berücksichtigung der longitudinalen Ganglienachse.

C) Weitere Auswertung der Bilder

Es wurde zusätzlich zum Durchmesser des der Mastzelle nächstgelegenen Gefäßes, sofern der Abstand zwischen Mastzelle und diesem Gefäß höchstens 20 μm betrug, dessen Wandstruktur zur Identifizierung beurteilt.

D) Nullhypothesen

Hintergrund: Es soll überprüft werden, ob die Mastzellen sich gehäuft in der Nähe von Blutgefäßen befinden, d.h. die gemessene Distanz zwischen Mastzelle und Gefäß unterscheidet sich von der erwarteten Distanz bei diesbezüglich zufälliger Verteilung der Mastzelle und noch mehr vom maximal möglichen Abstand zu einem Gefäß.

Untersucht werden soll auch, ob bei den Abständen der Mastzelle zum Gefäß und den Gefäßabständen selbst Unterschiede zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum bestehen.

Es wurden die folgenden Nullhypothesen formuliert:

- Die Grundgesamtheiten der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß und
 - der maximal möglichen Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-pos. Gefäß,
 - der halbmaximalen Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-pos. Gefäß sowie
 - der Abstände der RECA-1-positiven Gefäße untereinanderunterscheiden sich nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß sowie die Abstände der RECA-1-positiven Gefäße untereinander unterscheiden sich zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

2.2.5.3 Auszählung der Mastzellen

A) Auszählung und Datenverarbeitung

Jedes Ganglion wurde bezüglich der longitudinalen Ganglienachse in drei Etagen eingeteilt, den beiden Polen sowie dem Zentrum, die jeweils ein Drittel der Ganglienlängsachse betragen. Aus den angefertigten Aufnahmeprotokollen konnte für jede Etage die dort vorgefundene Anzahl an Mastzellen bestimmt werden. Die Auszählung erfolgte getrennt nach Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum. Die Daten wurden in die Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97 eingegeben und dort weiterverarbeitet; die statistische Testung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 10.0.

B) Nullhypothesen

Hintergrund: Es ist von Interesse, ob ein Unterschied zwischen den Mastzellzahlen dreier gleich großer Etagen in der Ganglienlängsachse, also zwischen dem Zentrum und den beiden Polen des Ganglions, besteht. Ferner soll auf einen möglichen Unterschied bei der Verteilung der Mastzellen zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum hin untersucht werden.

Es wurden die folgenden Nullhypothesen formuliert:

- Die Grundgesamtheiten der Mastzellzahlen dreier gleich großer Etagen der longitudinalen Ganglienachse unterscheiden sich untereinander nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Mastzellzahlen dreier gleich großer Etagen der longitudinalen Ganglienachse unterscheiden sich zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

2.2.5.4 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und VACht bzw. von 5-HT₃-Rezeptor und Synaptophysin

A) Bildverarbeitung

Die digitalisierten Bildpaare wurden im Programm Adobe Photoshop 5.0 in Graustufenbilder umgewandelt, invertiert, und anschließend wurde ein individueller Schwellenwert gesetzt, der zwischen positiven und negativen Bildelementen bezüglich Vorkommen des markierten Antigens separiert. Diese binären Schwarzweißbilder wurden im Graustufenmodus belassen, die nun schwarz gefärbten, positiven Bildflächen mit einem Grauton mittlerer Helligkeit eingefärbt und in transparenter Form mit Hilfe zweier Ebenen übereinandergelegt. Durch positive Multiplikation dieser beiden Ebenen miteinander stellten sich alle Überschneidungsflächen der beiden Bilder in einem sehr viel dunkleren Grauton dar. Das Bildpaar wurde

auf eine Hintergrundebene reduziert, anschließend wurden die dunkelgrauen überlappenden Bereiche mittels Setzen eines Schwellenwerts vom Rest des Bildes getrennt, umgewandelt in ein binäres Schwarzweißbild und gespeichert.

B) Bildvermessung

Es existierten jetzt drei Schwarzweißbilder: Jeweils ein invertiertes Bild der positiven Fluoreszenzbereiche der Darstellung von Rezeptor und Synapse und ein Bild deren Überschneidung. Die anschließende Vermessung erfolgte mit Hilfe des Programmes Scion Image, das mittels eines auf gleiche Weise fotografierten Objektmikrometers kalibriert wurde. Hierbei erfolgte die Messung der positiven Flächen (in μm^2) jedes Bildes, d.h. Gesamtfläche von Rezeptoren, Synapsen und deren Schnittfläche, und das Zählen der mittels des jeweiligen Antikörpers dargestellten punktförmigen Synapsen.

C) Quantitative Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden in die Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97 importiert. Mit Hilfe eines für diesen Zweck programmierten Formulars wurden aus den gemessenen Parametern

- Gesamtfläche der VAcHT- bzw. Synaptophysin-positiven Synapsen
- Gesamtfläche der 5-HT₃-Rezeptor-tragenden Strukturen
- Schnittfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Synapsen
- Anzahl der Synapsen

und der festen Größe der

- Gesamtbildfläche

folgende Werte rechnerisch bestimmt:

- Verhältnis der Überschneidungsfläche, bezogen auf die Synapsenfläche
- Verhältnis der Überschneidungsfläche, bezogen auf die Serotoninrezeptorenfläche
- Verhältnis der Synapsengesamtfläche zur Rezeptorengesamtfläche
- Fläche einer einzelnen Synapse
- rechnerische Anzahl der Synapsen, die sich mit 5-HT₃-Rezeptoren schneiden, und deren Anteil an der Gesamtzahl der Synapsen
- Verhältnis der Gesamtfläche der Synapsen zur Gesamtbildfläche
- Verhältnis der Gesamtfläche der 5-HT₃-Rezeptoren zur Gesamtbildfläche

Diese beschriebene Auswertung erfolgte getrennt nach Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum und nach der longitudinalen Ganglienachse, um mögliche topographische Differenzen erfassen zu können.

D) Nullhypothesen:

Hintergrund: Untersucht werden soll, ob sich durch immunhistochemische Markierung des VACHT und von Synaptophysin im Gewebeschnitt jeweils gleiche Synapsengesamtflächen detektieren lassen, d.h. die Äquivalenz beider Markierungen soll getestet werden. Da die Daten jeweils aus Doppelmarkierungen des VACHT bzw. von Synaptophysin zusammen mit dem 5-HT₃-Rezeptor gewonnen werden, kann durch Vergleich der Serotoninrezeptorflächen jeder Doppelmarkierung auch die Güte speziell dieser Immunhistochemie geprüft werden. Wichtig ist die Überprüfung, ob sich die Fläche der Kolo-kalisation von Synapsen und 5-HT₃-Rezeptoren von der Synapsenfläche unterscheidet. Ferner soll auf einen möglichen Unterschied der Synapsenfläche, 5-HT₃-Rezeptorenfläche und deren Überschneidungsfläche in der Gangli-längsachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum untersucht werden.

Es wurden die folgenden Nullhypothesen formuliert:

- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Synapsenfläche, 5-HT₃-Rezeptorenfläche und deren Überschneidungsfläche unterscheiden sich jeweils bei der immunhistochemischen Synapsendarstellung durch Markierung von VACHT und Synaptophysin nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Synapsenfläche und der Überschneidungsfläche zwischen Synapsen und 5-HT₃-Rezeptoren unterscheiden sich nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Synapsenfläche, 5-HT₃-Rezeptorenfläche und deren Überschneidungsfläche unterscheiden sich über drei Etagen der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

2.2.5.5 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und PGP 9.5

A) Bildverarbeitung

Im Programm Adobe Photoshop 5.0 wurden die digitalisierten Schwarzweiß-Bildpaare in Graustufenbil-der konvertiert und anschließend invertiert. Die Trennung zwischen positiven und negativen Bildelemen-ten bezüglich des markierten Antigens erfolgte durch Setzen eines individuellen Schwellenwertes. Die so entstandenen binären Schwarzweißbilder wurden für die weitere Verarbeitung zwischengespeichert. Über die Darstellung der durch PGP 9.5 markierten Neurone wurde eine zweite Ebene gelegt und in dieser alle Perikaryen durch Nachzeichnen und Ausfüllen separat dargestellt und gespeichert. Im nächsten Schritt wurde das Differenzbild dieser beiden Ebenen, also die selektive Darstellung aller Dendriten und Axone der Neurone, erzeugt und gespeichert. Jetzt wurde die gespeicherte Darstellung der 5-HT₃-Rezeptoren als Hintergrund geladen und wiederum eine zweite Ebene angelegt. In die Vordergrundsebene wurden zwecks Schnittbilderstellung die Darstellung der Perikaryen und das Bild der Axone und Dendriten einge-

fügt. Für beide Fälle wurde auf gleiche Art weiterverfahren: Alle schwarzen Flächen dieser drei Bilder wurden in einem Grauton mittlerer Helligkeit ausgefüllt. Durch positive Multiplikation dieser beiden Ebenen miteinander stellten sich alle Schnittflächen der beiden Bilder in einem sehr viel dunkleren Grauton dar. Das Bildpaar wurde auf eine Hintergrundebene reduziert, anschließend wurden die dunkelgrauen überlappenden Bereiche mittels Setzen eines Schwellenwerts vom Rest des Bildes getrennt, umgewandelt in ein binäres Schwarzweissbild und gespeichert.

B) Bildvermessung

Es lagen nun folgende fünf Bilder vor: Je ein invertiertes binäres Schwarzweißbild der 5-HT₃-Rezeptoren und der PGP 9.5-positiven Perikaryen und Axone bzw. Dendriten der Neurone sowie jeweils ein Schnittbild der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Perikaryen und den Axonen bzw. Dendriten. Die Vermessung dieser Bilder erfolgte mit dem Programm Scion Image, das mit einem auf gleiche Weise wie die Bilder fotografierten Objektmikrometer kalibriert wurde. Bei der nun folgenden Messung der positiven Flächen wurden die Gesamtflächen der 5-HT₃-Rezeptoren, der Perikaryen, der Axone bzw. Dendriten und der Überschneidung der Perikaryen bzw. der Axone bzw. Dendriten mit den 5-HT₃-Rezeptoren bestimmt. Des Weiteren wurde die Gesamtzahl der Neurone, der 5-HT₃-Rezeptor-positiven Neurone, und Neurone, die den Serotoninrezeptor innerhalb des Zytoplasmas aufwiesen, ausgezählt.

C) Quantitative Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden in die Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97 importiert. In einem speziell hierfür programmierten Formular wurden aus den gemessenen Parametern

- Gesamtfläche der Perikaryen
- Gesamtfläche der Axone bzw. Dendriten
- Gesamtfläche der 5-HT₃-Rezeptoren
- Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Perikaryen
- Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Axonen bzw. Dendriten
- Anzahl der PGP 9.5 positiven Neurone
- Anzahl der 5-HT₃-Rezeptor-positiven Neurone
- Anzahl der Neurone mit 5-HT₃-Rezeptoren innerhalb des Zytoplasmas

und der festen Größe der

- Gesamtbildfläche

folgende Werte rechnerisch bestimmt:

- Gesamtfläche der Neurone

- Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Neuronen
- Verhältnis der Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Neuronen zur Neuronengesamtfläche
- Verhältnis der Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Perikaryen zur Perikaryengesamtfläche
- Verhältnis der Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Axonen bzw. Dendriten zur Axon- /Dendritengesamtfläche
- Verhältnis der Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Perikaryen zur Rezeptorengesamtfläche
- Verhältnis der Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Axonen bzw. Dendriten zur Rezeptorengesamtfläche
- Anteil der 5-HT₃-Rezeptoren an der Gesamtbildfläche
- Anteil der Neurone an der Gesamtbildfläche
- Anteil der Perikaryen an der Neuronenfläche
- Anteil von Axonen bzw. Dendriten an der Neuronenfläche
- Verhältnis der 5-HT₃-Rezeptorenfläche an den Perikaryen zu der Rezeptorenfläche an den Axonen bzw. Dendriten
- Anteil der 5-HT₃-Rezeptor-positiven Neurone
- Anteil der 5-HT₃-Rezeptor-positiven Neurone mit Rezeptoren im Zytoplasma

Diese beschriebene Auswertung erfolgte wiederum getrennt nach Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum sowie nach der longitudinalen Ganglienachse.

D) Nullhypothesen:

Hintergrund: Es soll auf einen möglichen Unterschied der Messparameter „Fläche der Neurone“, „Fläche der Perikaryen“, „Fläche der Axone und Dendriten“, „Fläche der 5-HT₃-Rezeptoren“, „Überschneidungsflächen der 5-HT₃-Rezeptoren mit Neuronen, mit Perikaryen und mit Axonen und Dendriten“ in der Ganglienlängsachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum hin untersucht werden.

Es wurde die folgende Nullhypothese formuliert:

- Die Grundgesamtheiten der Messparameter „Fläche der Neurone“, „Fläche der Perikaryen“, „Fläche der Axone und Dendriten“, „Fläche der 5-HT₃-Rezeptoren“, „Überschneidungsflächen der 5-HT₃-Rezeptoren mit Neuronen, mit Perikaryen und mit Axonen und Dendriten“ unterscheiden sich

über drei Etagen der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

2.2.5.6 Auswertung der Bildpaare der Doppelmarkierung von 5-HT_{2A}-Rezeptor und RECA-1

A) Bildauswertung

Es wurde auf allen Bildpaaren die Gesamtzahl der RECA-1-positiven und der 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven Gefäße ausgezählt; dabei wurde der Außendurchmesser aller jeweils markierten Gefäße gemessen. Außerdem wurde die Anzahl der 5-HT_{2A}-positiven Gefäße registriert, deren Umfang zu mehr als der Hälfte von 5-HT_{2A}-Rezeptoren ausgekleidet ist.

B) Quantitative Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden in die Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97 eingegeben. Zusätzlich wurden das zahlenmäßige

- Verhältnis zwischen den 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven und den RECA-1-positiven Gefäßen und
- Verhältnis zwischen Gefäßen, deren Umfang mehr als zur Hälfte mit 5-HT_{2A}-Rezeptoren besetzt war, und der Zahl der 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven Gefäße

bestimmt.

Des Weiteren wurden sowohl die RECA-1-positiven als auch die 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven Gefäße nach ihrem Durchmesser zehn Kaliberklassen von 0-100 µm mit jeweils 10 µm Intervall zugeordnet und somit die Häufigkeit bestimmter Gefäßdurchmesser jeder Markierung bestimmt.

Alle genannten Auswertungen erfolgten getrennt nach Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum und nach der longitudinalen Ganglienachse.

C) Nullhypothesen:

Hintergrund: Verglichen werden soll der Anteil der 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven Gefäße an den RECA-1-positiven bei unterschiedlichem Gefäßkaliber, ebenso soll eine mögliche Korrelation zwischen dem Anteil 5-HT_{2A}-Rezeptor-tragender Gefäße der Größe des Gefäßkalibers überprüft werden. Ferner soll auf einen möglichen Unterschied der Anzahl der RECA-1- und 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiver Gefäße in der Ganglienlängsachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum hin untersucht werden.

Es wurden die folgenden Nullhypothesen formuliert:

- Die Grundgesamtheiten der Anteile 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiver Gefäße an den RECA-1-positiven Gefäßen unterscheiden sich zwischen unterschiedlichen Gefäßkaliberklassen nicht.
- Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der Größe des Gefäßkalibers und dem Anteil 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiver Gefäße.
- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Anzahl der RECA-1- und 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven Gefäße unterscheiden sich über drei Etagen der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

2.2.6 Statistische Testverfahren

Aufgrund der Unkenntnis der Verteilung der Grundgesamtheiten der jeweiligen Stichproben kamen für die Testung der Hypothesen nur verteilungsfreie, nichtparametrische Prüfverfahren in Betracht. Für den Vergleich, ob zwei Stichproben der Messwerte aus derselben Grundgesamtheit stammen, wurde der Mann-Whitney-Test, für den Vergleich, ob drei Stichproben der Messwerte aus derselben Grundgesamtheit stammen, der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Für die Untersuchung einer möglichen Korrelation (s. 2.2.5.6) zwischen einer Rangreihe X (Gefäßkaliberklassen) und einem dichotomen Merkmal Y (5-HT_{2A}-Rezeptorbesatz) fand die biseriale Rangkorrelation [Bortz und Lienert 1998] Verwendung; der sich hieraus ergebende rho-analoge Korrelationskoeffizient wurde mit Hilfe des U-Testes auf Signifikanz überprüft [Bortz und Lienert 1998]. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgesetzt.

2.2.7 Rezepturen der verwendeten Lösungen

2.2.7.1 Chromgelatinierte Objektträger

5 g Gelatine werden in 1 l Wasser gelöst und auf 35 °C erwärmt. Danach werden 0,5 g Chromalaun hinzugegeben und auf 40 °C weiter erwärmt. Die nun blaugrüne Lösung wird im Wasserbad auf 15-20 °C abgekühlt und mit einem Faltenfilter filtriert. Die autoklavierten Objektträger werden nun für 10 Minuten eingetaucht und über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet.

2.2.7.2 Phosphatpuffer, 0,2 M

Stammlösung A: 31,2 g/l Natriumdihydrogenphosphat NaH₂PO₄ x 2 H₂O

Stammlösung B: 35,6 g/l Dinatriumhydrogenphosphat Na₂HPO₄ x 2 H₂O

230 ml von Stammlösung A werden mit 770 ml der Stammlösung B gemischt, danach wird der pH auf 7,4 eingestellt.

2.2.7.3 Vorspüllösung nach Forssmann et al. [1977]

25	g	PVP (Polyvinylpyrrolidon, MG 40.000)
9	g	NaCl
5	g	Procainhydrochlorid
1000	ml	Aqua dest.

Der pH wird auf 7,4 eingestellt, anschließend eine Membranfiltration bei einer Porengröße von 0,6-3 µm durchgeführt. Unmittelbar vor der Perfusion werden der Vorspüllösung 2 ml Heparin zugegeben.

2.2.7.4 Fixationslösung nach Zamboni et al. [1967]

50 ml	Formalinlösung, 37%ig		
150 ml	Pikrinsäure (gesättigte Lösung)		
500 ml	0,2 M Phosphatpuffer	ad 1000 ml	Aqua dest.

2.2.7.5 PBS (phosphate-buffered saline) und PBS mit doppeltem Salzgehalt

Stammlösung A:	31,2	g/l	Natriumdihydrogenphosphat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
Stammlösung B:	35,6	g/l	Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

28,75 ml von Lösung A werden mit 96,2 ml von Lösung B gemischt, danach werden 22,4 g Kochsalz (NaCl) zugegeben. Für PBS mit doppeltem Salzgehalt gibt man 44,8 g Kochsalz hinzu. Zuletzt wird auf 5000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und der pH auf 7,4 eingestellt.

2.2.7.6 Präinkubationslösung

In PBS werden gelöst:	10 %	NSS (normales Schweineserum)
	0,5 %	Tween 20
	0,1 %	BSA (bovine serum albumin)

2.2.7.7 Carbonatgepufferte Glycerollösung

Lösung A:	53	g/l	Natriumcarbonat	Na_2CO_3
Lösung B:	42	g/l	Natriumhydrogencarbonat	NaHCO_3
Lösung C:			wasserfreies Glycerol	

Lösung B wird mit Hilfe von Lösung A auf einen pH von 8,6 eingestellt, danach auf einen Teil dieser Pufferlösung zwei Teile Glycerol gegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Befunde der Versuchsreihe A

3.1.1 Darstellung von Serotonin

Der Antikörper gegen Serotonin markiert in allen Gewebeschnitten ausschließlich rund-ovale, solitäre Zellen (vgl. Abb. 3.1); an Neuronen, Glia und Gefäßen ist keine Serotonin-Immunreaktivität nachweisbar. Im Zytoplasma der serotoninpositiven Zellen zeigen sich feine Granula mit intensiver Fluoreszenz. Diese fluoreszierenden Granula überstrahlen sich teilweise gegenseitig und besitzen eine Größe von weniger als 1 μm . Sie sind oft nicht einzeln zu erkennen und imponieren durch eine homogen erscheinende Fluoreszenz von wenigen Mikrometern Größe im Bereich des Zytoplasmas. Ein Anschnitt des Kernes der serotoninpositiven Zellen bleibt weitgehend fluoreszenzfrei; liegen serotoninpositive Granula oberhalb oder unterhalb des Kernanschnittes, so wird auch er überstrahlt und erscheint einheitlich serotoninpositiv, ohne dass sich seine Konturen oder ein Nucleolus erkennen lassen.

Die Verteilung der serotoninpositiven Zellen erweist sich topographisch als homogen und übereinstimmend zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum.

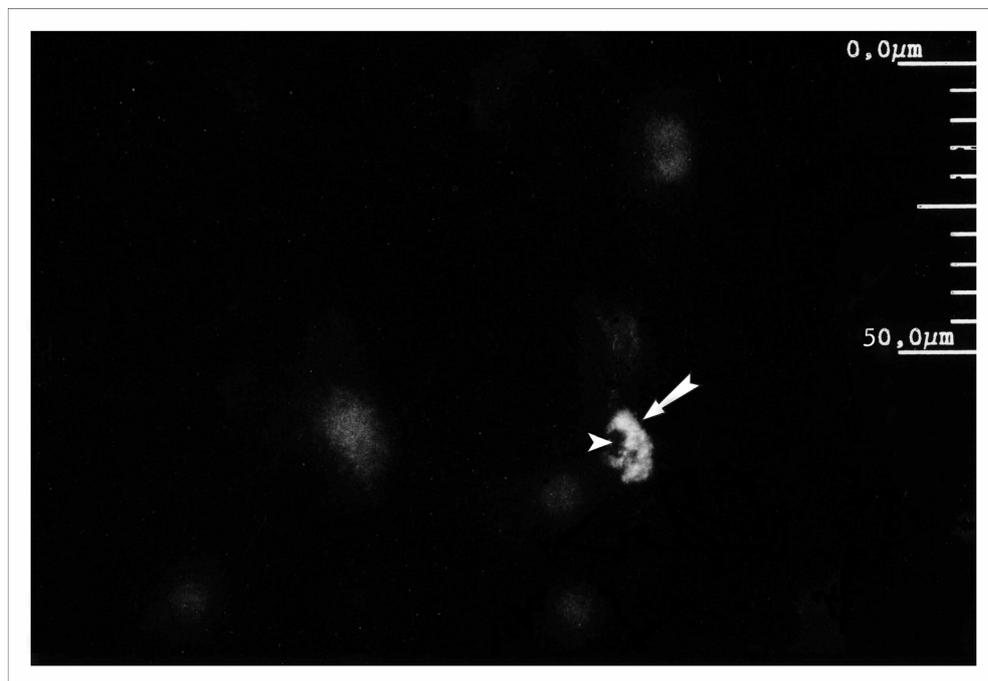


Abb. 3.1: Immunfluoreszenz: Markierung von Serotonin, Ganglion cervicale superius der Ratte.

Zu sehen ist Serotonin-Immunreaktivität einer rund-ovalen Zelle von ca. 12 μm Durchmesser (Pfeil).

Intensive Fluoreszenz findet sich granulär innerhalb des Zytoplasmas; der Kern (Pfeilspitze) bleibt fluoreszenzfrei.

3.1.2 Darstellung des GluT-1

Immunreaktivität gegen den GluT-1 lässt sich an Gefäßen und am Perineurium nachweisen. Das GluT-1-positive Perineurium stellt sich als geschlossene, bandförmige Begrenzung des Ganglions mit zum Teil fibrillärer Struktur dar (vgl. Abb. 3.4); seine Dicke beträgt etwa 10 µm. Das im Präparat unversehrte Perineurium trägt den GluT-1 lückenlos. Es fallen bei der immunhistochemischen Darstellung keine regionalen Differenzen sowie keine Unterschiede zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum auf.

GluT-1-Immunreaktivität lässt sich an vielen Gefäßen nachweisen; bei geringer Vergrößerung stellt sich die Verteilung der GluT-1-positiven Gefäße inhomogen dar (vgl. Abb. 3.2). Ohne erkennbare Regelmäßigkeit zeigen sich Regionen, in denen sich deutlich weniger GluT-1-positive Gefäße finden als in anderen Gebieten. Eine Verteilung der GluT-1-positiven Gefäße zugunsten des Zentrums oder der Peripherie eines Ganglienquerschnittes lässt sich nicht feststellen; ebenfalls zeigt das Vorkommen dieser Gefäße bezüglich der longitudinalen Ganglienachse trotz der erwähnten Inhomogenitäten ein gleichmäßiges Bild.

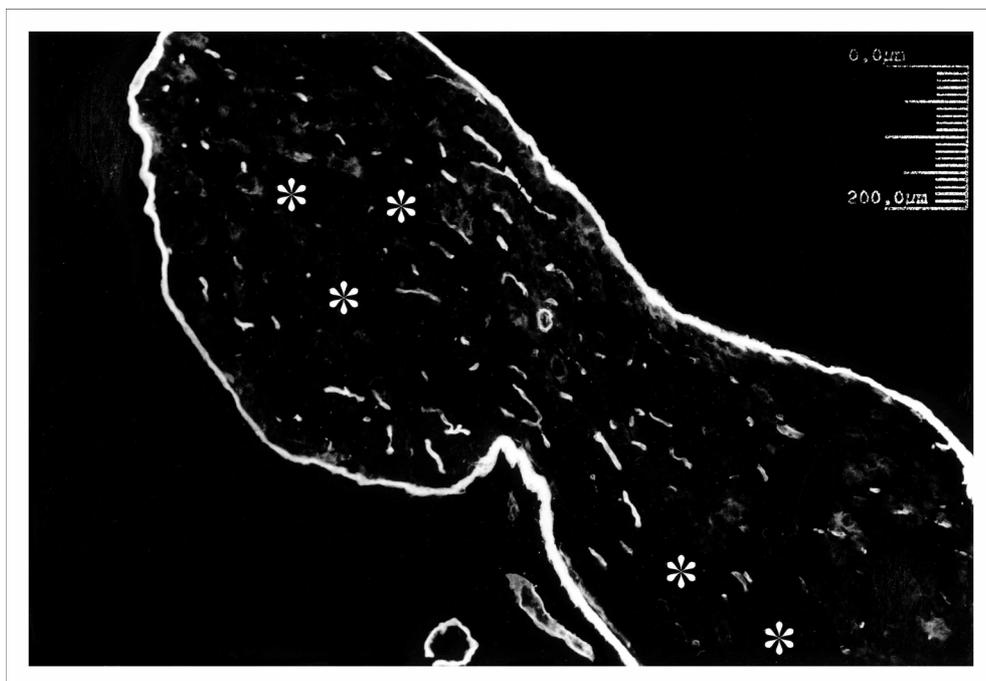


Abb. 3.2: Immunfluoreszenz: Markierung des GluT-1, Ganglion stellatum der Ratte im Längsschnitt. Es finden sich Regionen mit geringerer Anzahl GluT-1-positiver Gefäße (Sterne) und solche mit höherer Anzahl GluT-1-positiver Gefäße. Man beachte ferner die im Schnitt lückenlose Einscheidung des Ganglion stellatum in GluT-1-positives Perineurium.

3.1.3 Darstellung von RECA-1

Durch Markierung des Antigens RECA-1 lassen sich selektiv Gefäßendothelien darstellen (vgl. Abb. 3.3). Meist zeigen die positiven Gefäße eine einheitliche, bandförmige RECA-1-Immunreaktivität, einige jedoch wurden in der Mitte ihrer Längsachse oder quer geschnitten, so dass in der Immunfluoreszenz zwei

parallel verlaufende Endothelwandungen oder ein kreisförmiger Querschnitt zu erkennen sind. Das Gros der vorhandenen RECA-1-positiven Gefäße hat ein Kaliber bis maximal 30 μm ; mit zunehmenden Gefäßdurchmesser sinkt auch die Wahrscheinlichkeit, ein solches Gefäß in den untersuchten Ganglien anzutreffen. Die RECA-1-positiven Gefäße sind sehr gleichmäßig in den Ganglien verteilt; das trifft sowohl für einen Längs- als auch für einen Querschnitt zu. Ein Unterschied in der Verteilung der RECA-1-positiven Gefäße bezüglich der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum ist nicht feststellbar. In Übereinstimmung mit Forssmann [1964] fällt jedoch die Orientierung der meisten Gefäße parallel zur longitudinalen Ganglienachse auf.



Abb. 3.3: Immunfluoreszenz: Markierung von RECA-1, Ganglion stellatum der Ratte im Längsschnitt. Man erkennt viele RECA-1-positive Gefäße mit einem Durchmesser von etwa 10 μm ; sie scheinen gleichmäßig im Ganglion verteilt zu sein.

3.1.4 Doppelmarkierung von Serotonin und GluT-1

Die serotoninpositiven Mastzellen zeigen eine auffallende Anhäufung im Bereich des GluT-1-positiven Perineuriums (vgl. Abb. 3.4 und 3.5), sowohl von extra- als auch von intraganglionär. Ein geringer Teil der immunhistochemisch dargestellten Mastzellen befindet sich sogar unmittelbar im Perineurium. Andererseits lassen sich intraganglionär Mastzellen markieren, die sich in ihrer Lage nicht am Perineurium orientieren. Einige von ihnen findet man in der Nähe von GluT-1-positiven Gefäßen. Diese Befunde erweisen sich als topographisch homogen und zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum als übereinstimmend.

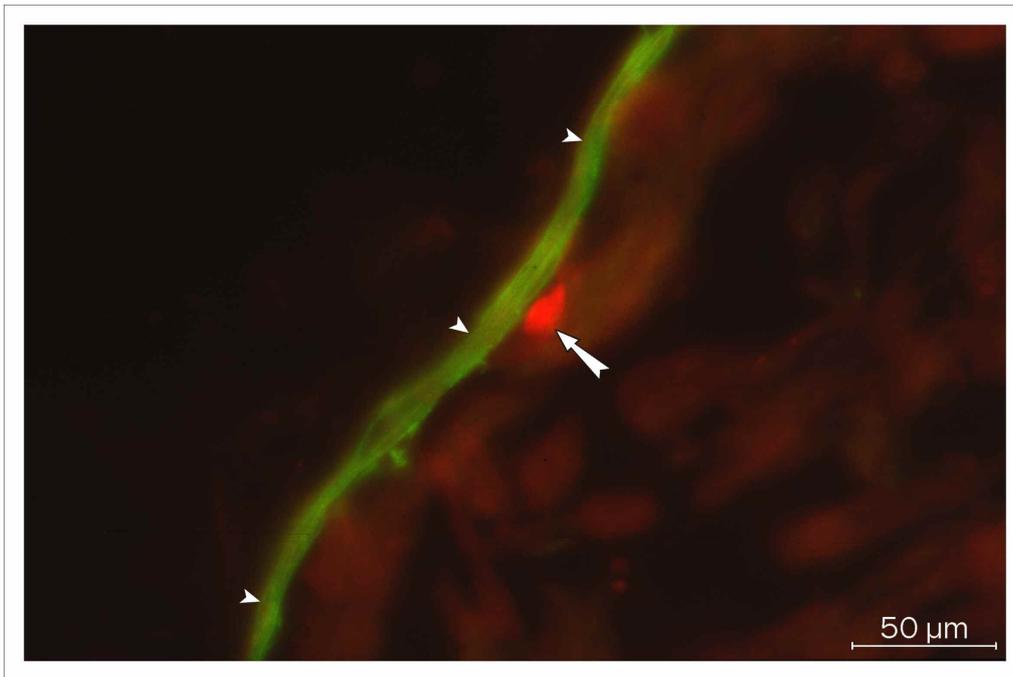


Abb. 3.4: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung von GluT-1 (FITC, grün) und von Serotonin (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Die rote, serotoninpositive Mastzelle (Pfeil) befindet sich unmittelbar am grünen, GluT-1-positiven Perineurium (Pfeilspitzen). Man beachte ferner den schichtenweisen Aufbau des Perineuriums.

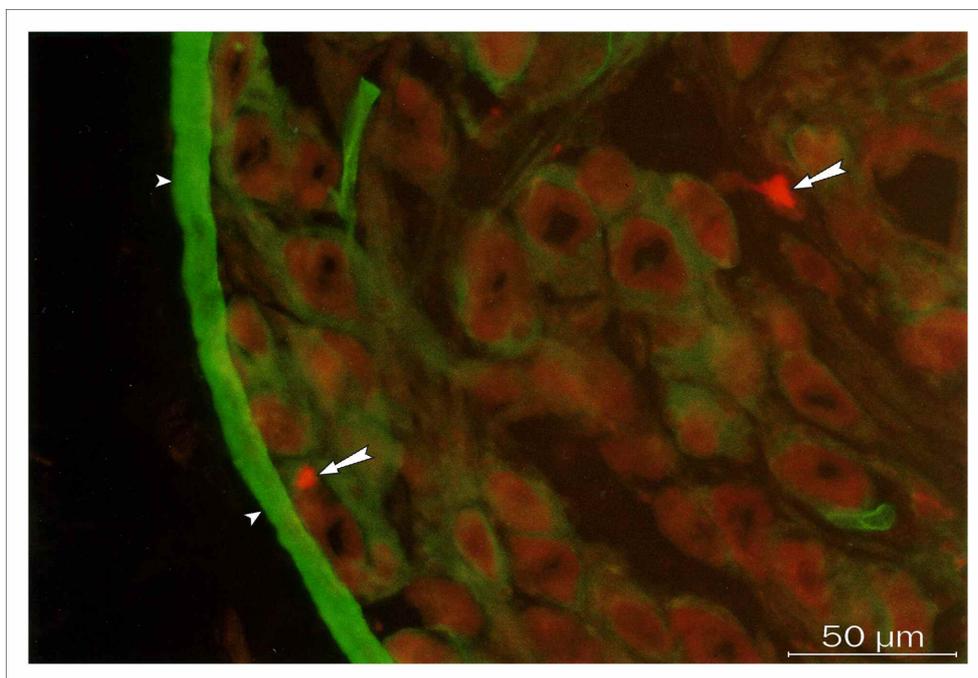


Abb. 3.5: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung von GluT-1 (FITC, grün) und von Serotonin (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Zu sehen sind zwei rote, serotoninpositive Mastzellen (Pfeile). Eine befindet sich etwa 10 µm vom grünen, GluT-1-positiven Perineurium (Pfeilspitzen) entfernt; die andere Mastzelle befindet sich intraganglionär; ein topographischer Bezug zu einer GluT-1-positiven Struktur kann nicht hergestellt werden.

3.1.5 Doppelmarkierung von Serotonin und RECA-1

Es fällt eine deutliche Annäherung der intraganglionär gelegenen, serotoninpositiven Mastzellen an RECA-1-positive Gefäße auf (vgl. Abb. 3.6). Betrachtet man mehrere markierte Gefäße mitsamt einer serotoninpositiven Mastzelle, so findet sich häufig die Mastzelle in unmittelbarer Gefäßnähe. Die topographische Annäherung der immunhistochemisch dargestellten Mastzelle an die RECA-1-positiven Gefäße unterscheidet sich weder regional, noch in der Ganglienlängsachse, noch zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum.

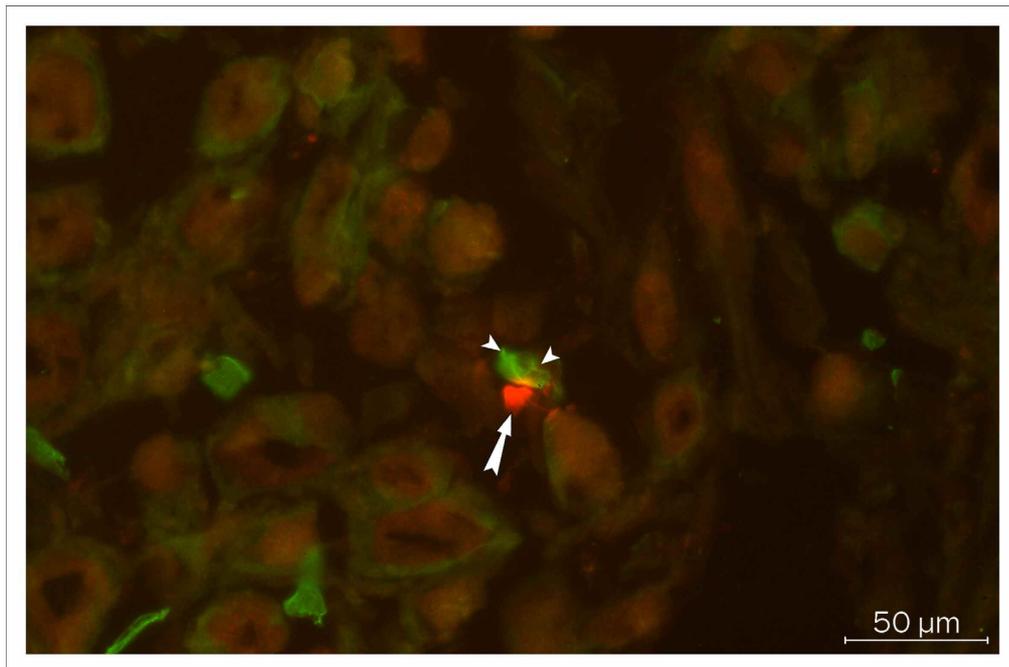


Abb. 3.6: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung von RECA-1 (FITC, grün) und von Serotonin (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Die rote, serotoninpositive Mastzelle (Pfeil) befindet sich unmittelbar an einem RECA-1-positiven Gefäß (Pfeilspitzen).

3.1.6 Doppelmarkierung von GluT-1 und RECA-1

Es fällt auf, dass sich durch Markierung des Antigens RECA-1 wesentlich mehr Gefäße darstellen lassen als durch Markierung des GluT-1 (vgl. Abb. 3.7). Die RECA-1-positiven Gefäße erweisen sich als homogener verteilt als die GluT-1-positiven. Es existieren ohne erkennbare Regelmäßigkeit Regionen, in denen sehr viel mehr Gefäße RECA-1- als GluT-1-Immunreaktivität zeigen, an anderer Stelle beträgt das Verhältnis zwischen beiden etwa 1:1. Eine Bevorzugung einer bestimmten Region zugunsten eines hohen oder niedrigen Anteils GluT-1-positiver Gefäße kann weder im Querschnitt noch in der Ganglienlängsachse gefunden werden; zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum findet sich diesbezüglich Übereinstimmung. Insbesondere bei Gefäßquerschnitten zeigt sich, dass durch Markierung von

RECA-1 das Endothel dargestellt wird, der GluT-1 sich jedoch vornehmlich in darumliegenden Schichten findet, wobei es sich um Teile der Gefäßwand oder um perineurale Septen handeln kann, die die Gefäße umhüllen.

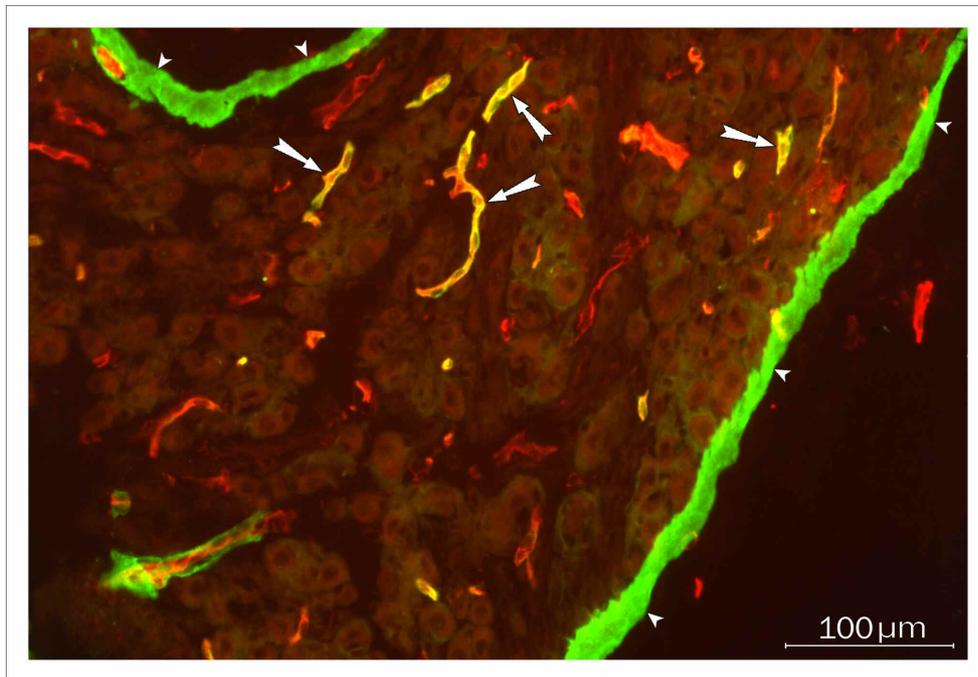


Abb. 3.7: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung des GluT-1 (FITC, grün) und von RECA-1 (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Man erkennt viele rote, RECA-1-positive Gefäße; Kokolorisation mit dem grün dargestellten GluT-1 führt zur Mischfarbe gelb (Pfeile); dies ist nur bei einem Teil der RECA-1-positiven Gefäße der Fall. Intensive GluT-1-Immunreaktivität findet sich auch am Perineurium (Pfeilspitzen).

3.2 Ergebnisse der quantitativen Auswertung: Versuchsreihe A

3.2.1 Mastzelle und Perineurium

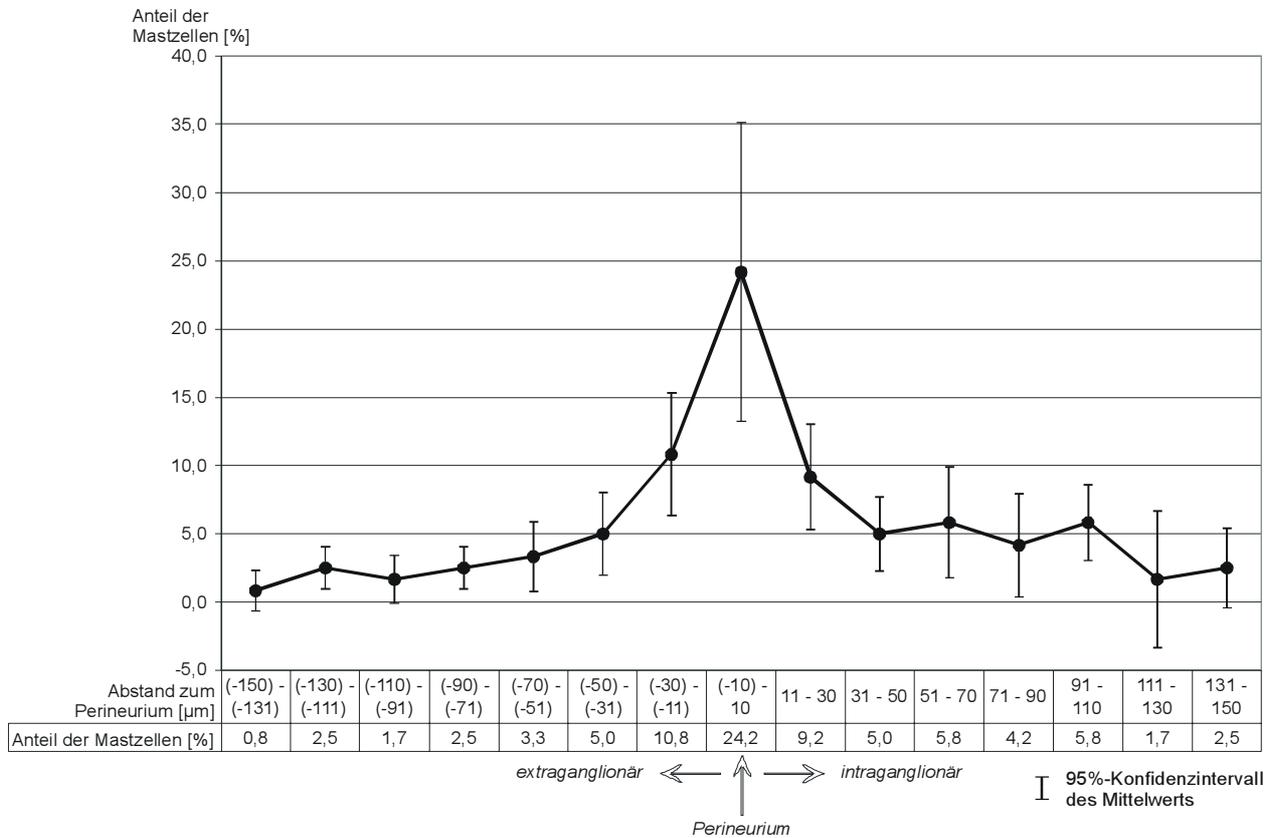


Abb. 3.8: Häufigkeit von Mastzellen in definierten Abständen zum Perineurium. Zu sehen sind die arithmetischen Mittelwerte mit Vertrauensbereich. Aufgetragen sind Anteile an der Zahl der insgesamt gefundenen Mastzellen (N=120). Es zeigt sich eine deutliche Anhäufung von Mastzellen am Perineurium. In einem Bereich von jeweils 10 µm Entfernung vom Perineurium nach intra- und extraganglionär findet sich fast ein Viertel aller gefundenen Mastzellen; mit größerem Abstand vom Perineurium nimmt die Zahl der Mastzellen zunächst rasch ab, bleibt dann intra- und extraganglionär ab etwa 50 µm Entfernung vom Perineurium relativ konstant. Weiter als 150 µm vom Perineurium entfernte Mastzellen wurden in die Graphik nicht aufgenommen.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Bildvermessung in Form von Mittelwerten mit Standardabweichung aufgeführt (s. Abb. 3.8 sowie Tab. 1 im Anhang).

Von allen immunhistochemisch gefundenen Mastzellen befinden sich $8,3\% \pm 9,7\%$ unmittelbar am GluT-1-positiven Perineurium, auf einen Abstand bis 20 µm nähern sich von extraganglionär $18,4\% \pm 16,7\%$ und von intraganglionär $10,9\% \pm 9,3\%$ dem Perineurium an. D.h. innerhalb eines Bereiches von 40 µm, in dessen Mitte sich das markierte Perineurium befindet, liegen insgesamt $37,6\% \pm 23,9\%$ aller dargestellten

Mastzellen. Extraganglionär liegen $17,5\% \pm 5,6\%$ aller serotoninpositiven Mastzellen in mindestens $21 \mu\text{m}$ Abstand zum GluT-1-positiven Perineurium, intraganglionär entfernen sich $30,0\% \pm 5,9\%$ aller gefundenen Mastzellen mindestens $21 \mu\text{m}$ bis maximal $150 \mu\text{m}$ vom Perineurium; die verbleibenden $13,3\% \pm 11,5\%$ von der Gesamtzahl der dargestellten Mastzellen findet man mehr als $150 \mu\text{m}$ vom Perineurium nach intraganglionär entfernt.

Statistisch wurden die folgenden Nullhypothesen geprüft:

- a) Die Anzahl der Mastzellen in einem Abstand von maximal $20 \mu\text{m}$ zum Perineurium entstammt derselben Grundgesamtheit wie die Anzahl der Mastzellen, die jeweils zwischen $21 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ nach intra- und extraganglionär vom Perineurium entfernt liegen.
- b) Die Anzahl der intraganglionär gelegenen Mastzellen einer Distanz von $21 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ vom Perineurium entstammt derselben Grundgesamtheit wie die Anzahl der extraganglionär gelegenen Mastzellen einer Distanz von $21 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ vom Perineurium.
- c) Die Anzahl der Mastzellen in einem Abstand von maximal $20 \mu\text{m}$ zum Perineurium entstammt beim Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum derselben Grundgesamtheit; die Anzahlen der intra- und extraganglionär gelegenen Mastzellen, die eine Distanz von $21 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ vom Perineurium einnehmen, entstammt beim Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum jeweils derselben Grundgesamtheit.

Die Nullhypothesen a) und b) wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests überprüft. Die Anzahl der Mastzellen in einem Abstand von maximal $20 \mu\text{m}$ zum Perineurium entstammt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ nicht derselben Grundgesamtheit wie die Anzahl der Mastzellen, die jeweils zwischen $21 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ nach intra- und extraganglionär vom Perineurium entfernt liegen (vgl. Abb. 3.9). Der Unterschied zwischen der Mastzellzahl der vom Perineurium entfernten Klasse und der Zahl der das Perineurium einschließenden Klasse ist jeweils von intra- und extraganglionär statistisch signifikant. Die Nullhypothese b) einer Übereinstimmung in der Grundgesamtheit der Mastzellzahlen zwischen den beiden entfernten Klassen kann mit $p = 0,8$ nicht abgelehnt werden; für den Bereich zwischen $21 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ Abstand vom Perineurium ist die Verteilung der Mastzellen intra- und extraganglionär zahlenmäßig nicht signifikant unterschiedlich.

Die Nullhypothese c) wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests überprüft und kann nicht verworfen werden; das Signifikanzniveau wird mit $p = 0,31$ nicht unterschritten (vgl. Abb. 3.9). Es findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied der drei Parameter zwischen den beiden untersuchten Ganglien.

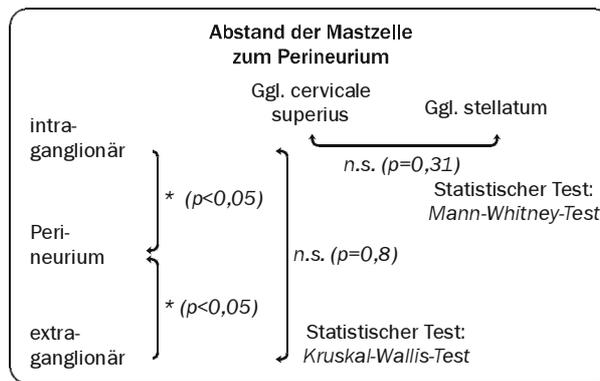


Abb. 3.9: Dargestellt sind die Ergebnisse der statistischen Testung (N=120 Mastzellen insgesamt). Im Bereich von 20 μm Distanz um das Perineurium finden sich signifikant (*) höhere Mastzellzahlen als intra- und extraganglionär im angrenzenden Bereich von 21-50 μm Abstand um das Perineurium; die beiden Bereiche von 21-50 μm um das Perineurium unterscheiden sich in ihrer Mastzellzahl intra- und extraganglionär nicht signifikant (n.s.). Die Mastzellzahlen der drei genannten Abstandsklassen vom Perineurium unterscheiden sich zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht signifikant (n.s.).

3.2.2 Mastzelle und GluT-1-positives Gefäß

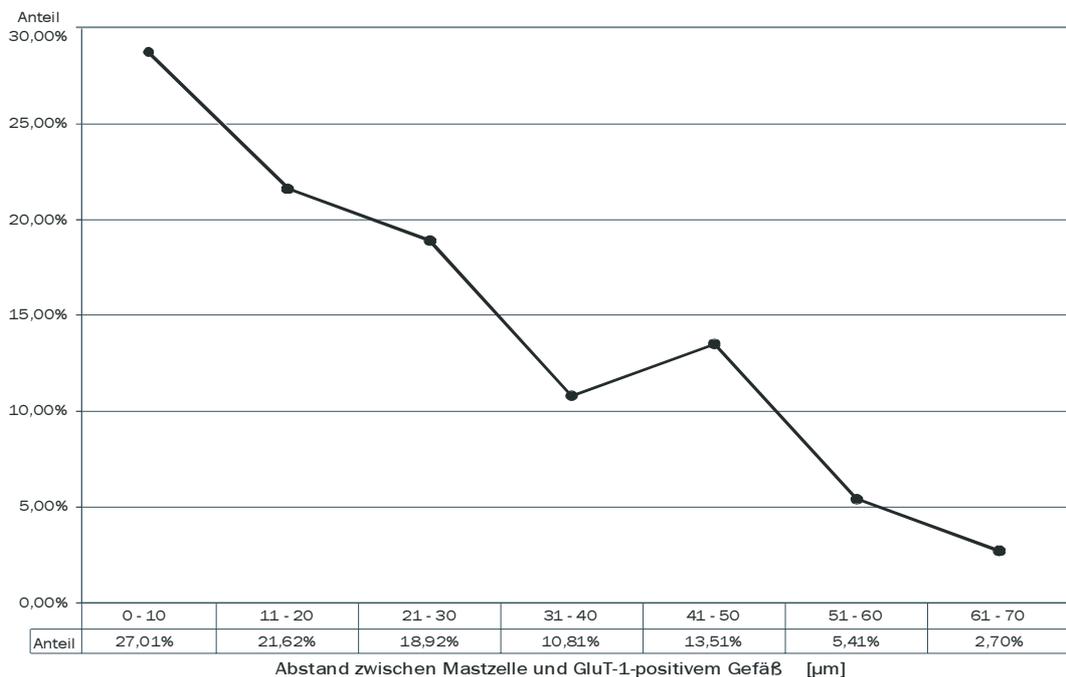


Abb. 3.10: Graphische Darstellung der Abstände zwischen Mastzelle und dem jeweils nächsten GluT-1-positivem Gefäß (N=25). Aufgetragen sind Anteile an der Anzahl von Mastzellen, die sich in Abständen bis maximal 70 μm vom nächsten GluT-1-positivem Gefäß befinden. Vorrangig nehmen die Mastzellen Abstände zwischen 1 und 30 μm zum nächsten GluT-1-positivem Gefäß ein. Für eine Boxplotdarstellung aller Messwerte siehe Abb. 3.14.

Registriert wurden alle Mastzellen im Umkreis von maximal 70 μm um ein GluT-1-positives Gefäß. Als durchschnittlicher Abstand zwischen der Mastzelle und dem nächsten GluT-1-positiven Gefäß finden sich 30 μm (vgl. Abb. 3.10 sowie Tab. 2 und 5 im Anhang). Maximal 10 μm weit entfernen sich 27,0% der Mastzellen von einem GluT-1-positiven Gefäß, 48,6% der Mastzellen liegen höchstens 20 μm weit entfernt (vgl. Abb. 10). In einer Entfernung von 21 μm bis 40 μm zum nächsten GluT-1-positiven Gefäß finden sich 29,7% der gezählten Mastzellen.

3.2.3 Mastzelle und RECA-1-positives Gefäß

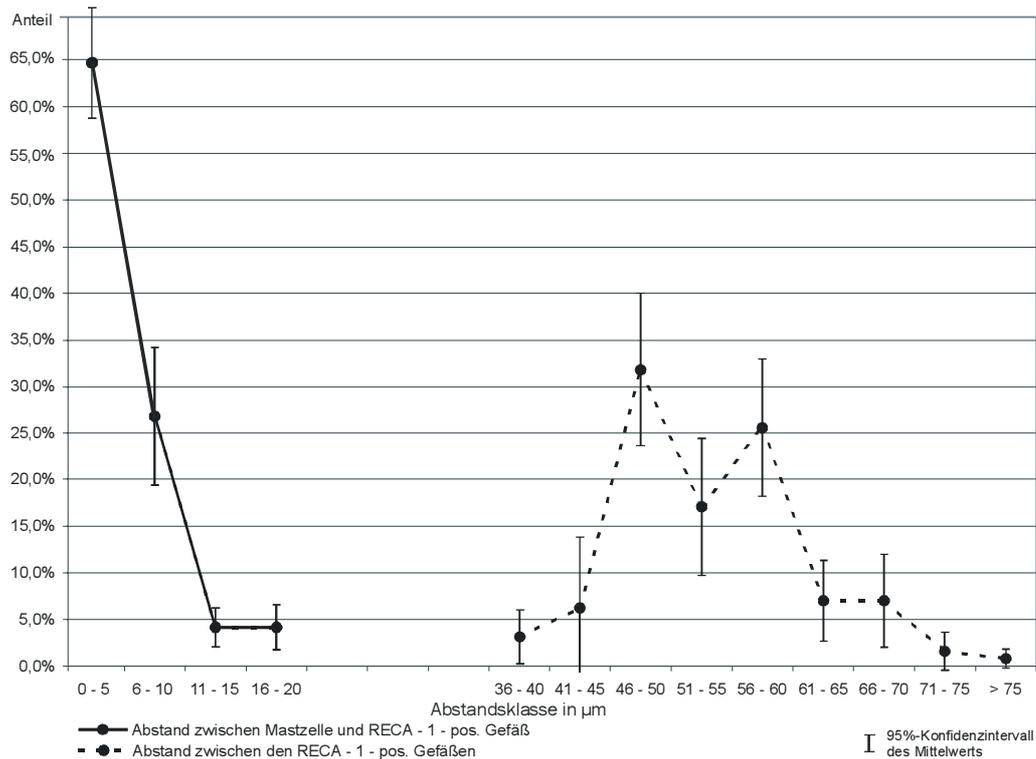


Abb. 3.11: Abstand zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß und zwischen den RECA-1-positiven Gefäßen untereinander. In der graphischen Darstellung der arithmetischen Mittelwerte mit Vertrauensbereich sind Anteile an der Gesamtzahl an Mastzellen bzw. RECA-1-positiven Gefäßen als Häufigkeiten definierter Abstandsklassen aufgetragen. Die Mastzellen nehmen größtenteils Abstände von 0-10 μm zum nächsten RECA-1-positiven Gefäß ein (N=97); die meisten RECA-1-positiven Gefäße sind zwischen 46 und 60 μm voneinander entfernt (N=130). Für eine Boxplotdarstellung aller Messwerte siehe Abb. 3.14.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Bildvermessung in Form von Mittelwerten mit Standardabweichung aufgeführt (vgl. dazu im Anhang Tabelle 2, 3 und 4).

Der durchschnittliche Abstand der RECA-1-positiven Gefäße untereinander beträgt $56 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$; der durchschnittliche Abstand zwischen serotoninpositiver Mastzelle und dem nächsten RECA-1-positivem Gefäß $5 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$. Klassifiziert man die Abstände dieser beiden Parameter mit einem Intervall von $5 \mu\text{m}$, zeigt sich, dass $64,9\% \pm 18,3\%$ der Mastzellen im Umkreis von maximal $30 \mu\text{m}$ Distanz zum nächsten RECA-1-positiven Gefäß einen Abstand von $0 \mu\text{m}$ bis $5 \mu\text{m}$ zu diesem Gefäß einnehmen (vgl. Abb. 3.11 sowie Tab. 3 im Anhang). $6 \mu\text{m}$ bis $10 \mu\text{m}$ weit vom nächsten RECA-1-positiven Gefäß entfernen sich $26,8\% \pm 12,0\%$ der Mastzellen, in einer Distanz von $11 \mu\text{m}$ bis $20 \mu\text{m}$ sind die restlichen $8,2\%$ der Mastzellen vorzufinden. Im Bereich bis maximal $5 \mu\text{m}$ Abstand zu einem RECA-1-positiven Gefäß finden sich also $65,0\%$ aller Mastzellen eines Umkreises von $30 \mu\text{m}$ Radius um ein RECA-1-positives Gefäß.

Bei einem Durchmesser der gefundenen Mastzellen von $11 \mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$ (vgl. Tab. 2 im Anhang) entspricht die Distanz zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß etwa dem halben Mastzellendurchmesser, d.h. die Mastzelle liegt im Schnitt eine halbe Eigenlänge von einem solchen Gefäß entfernt (vgl. Abb. 3.14). Man findet die meisten RECA-1-positiven Gefäße in Abständen von $46 \mu\text{m}$ bis $60 \mu\text{m}$ voneinander entfernt liegen (vgl. Abb. 3.11 sowie Tab. 2 und 3 im Anhang). Das Verhältnis des tatsächlichen Abstands zwischen Mastzelle und dem nächsten RECA-1-positiven Gefäß zu dem maximal möglichen Abstand zwischen beiden beträgt $0,23 \pm 0,21$; das Verhältnis des tatsächlichen Abstands zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß zu dem halbmaximalen Abstand ergibt $0,46 \pm 0,43$.

Der Durchmesser des der Mastzelle nächstgelegenen RECA-1-positiven Gefäßes, sofern der Abstand zwischen Mastzelle und diesem Gefäß höchstens $20 \mu\text{m}$ beträgt, wird mit $22 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$ bestimmt (vgl. Abb. 3.12 und Tab. 2 und 4 im Anhang). Mit einem Anteil von $29,9\%$ aller RECA-1-positiven, maximal $20 \mu\text{m}$ von einer Mastzelle entfernten Gefäße ist ein Gefäß mit einem Kaliber von $11 \mu\text{m}$ - $15 \mu\text{m}$ am häufigsten in der Nähe einer Mastzelle zu finden, gefolgt von Kalibern $16 \mu\text{m}$ - $20 \mu\text{m}$ mit $18,6\%$ und $21 \mu\text{m}$ - $25 \mu\text{m}$ mit $16,5\%$ (vgl. Abb. 3.12). Gefäße mit einem Durchmesser von $26 \mu\text{m}$ bis $30 \mu\text{m}$ stellen $15,5\%$ der maximal $20 \mu\text{m}$ von einer Mastzelle entfernten Gefäße dar, solche mit einem Durchmesser von $6 \mu\text{m}$ - $10 \mu\text{m}$ $9,3\%$; alle anderen Gefäßdurchmesser kommen in diesem Zusammenhang selten vor.

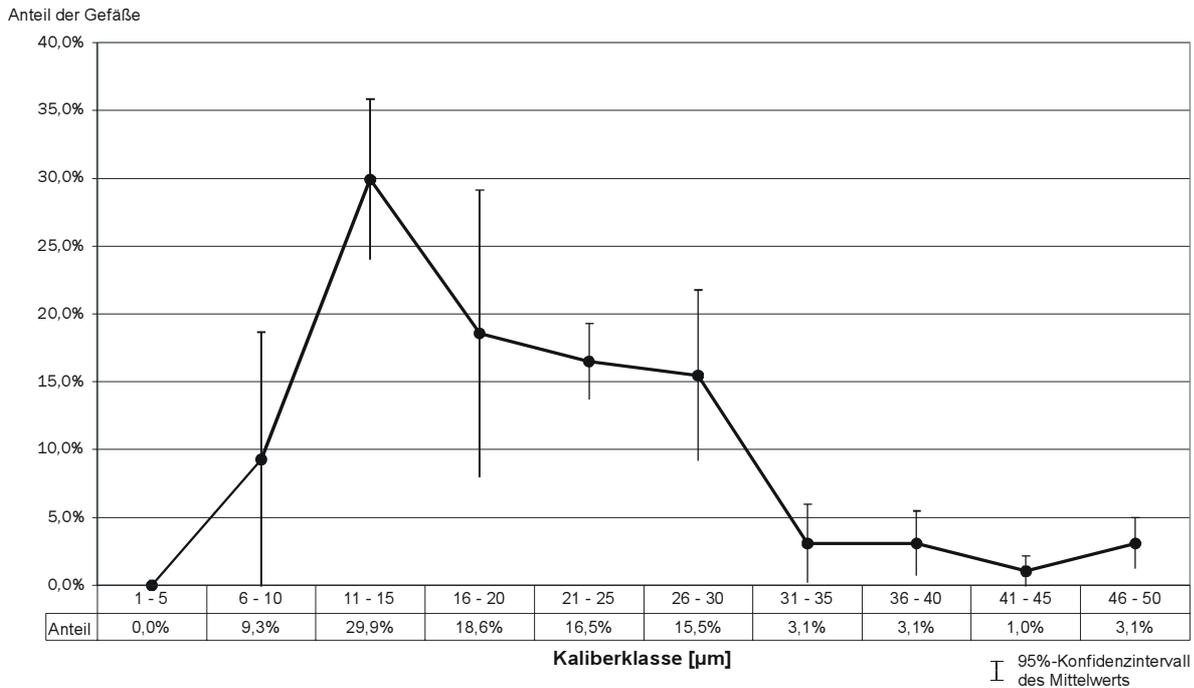


Abb. 3.12: Kaliber des der Mastzelle nächstgelegenen, maximal 20 µm entfernten Gefäßes. Graphische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte mit Vertrauensbereich (N=97). Das der Mastzelle nächstgelegene, maximal 20 µm entfernte Gefäß hat meist einen Durchmesser zwischen 11 und 30 µm; mit 29,9% aller maximal 20 µm von der Mastzelle entfernten Gefäße kommen Kaliber zwischen 11 und 15 µm am häufigsten vor. Für eine Boxplotdarstellung aller Messwerte siehe Abb. 3.14.

Statistisch wurden die folgenden Nullhypothesen geprüft:

- Die Grundgesamtheiten der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß und
 - der maximal zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß möglichen Abstände,
 - der halbmaximalen Abstände zwischen Mastzelle und Gefäß sowie
 - der Abstände der RECA-1-positiven Gefäße untereinander unterscheiden sich nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß sowie die Abstände der RECA-1-positiven Gefäße untereinander unterscheiden sich zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

Die Testung mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests auf einen Unterschied in der Grundgesamtheit der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß gegen die Abstände der RECA-1-positiven Gefäße untereinander sowie die maximal möglichen Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß zeigt jeweils eine statistisch signifikante Differenz; die Nullhypothese einer Übereinstimmung in der Grundgesamtheit kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ verworfen werden (vgl. Abb. 3.13). Jedoch erweist sich ein Unterschied zwischen den Grundgesamtheiten

der Abstände zwischen den RECA-1-positiven Gefäßen und des halbmaximalen Abstands zwischen Mastzelle und Gefäß durch den Mann-Whitney-Test als statistisch nicht signifikant; mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,07$ kann er jedoch als wahrscheinlich bezeichnet werden (vgl. Abb. 3.13). Die Nullhypothese einer Übereinstimmung der Grundgesamtheiten der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß sowie der Abstände der RECA-1-positiven Gefäße untereinander zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum kann mit $p=0,29$ nicht abgelehnt werden (vgl. Abb. 3.13).

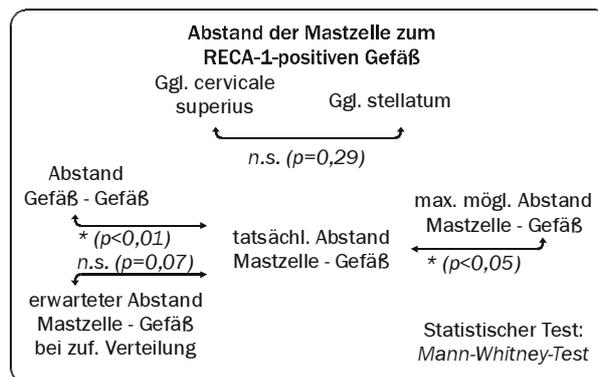


Abb. 3.13: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der statistischen Testung; zur Anwendung kam jeweils der nichtparametrische Mann-Whitney-Test ($N=97$). Ein Unterschied in der Grundgesamtheit der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß und sowohl dem Gefäßabstand als auch dem maximal möglichen Abstand zwischen Mastzelle und Gefäß erweist sich jeweils als signifikant (*). Ein Unterschied in der Grundgesamtheit der Abstände zwischen Mastzelle und RECA-1-positivem Gefäß und dem halben maximal möglichen Abstand zwischen Mastzelle und Gefäß („erwarteter Abstand“ bei zufälliger Verteilung der Mastzelle) erweist sich als statistisch nicht signifikant (n.s.). Die Grundgesamtheiten der Abstände der Gefäße untereinander sowie zwischen Mastzelle und Gefäß unterscheiden sich jeweils zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht signifikant (n. s.).

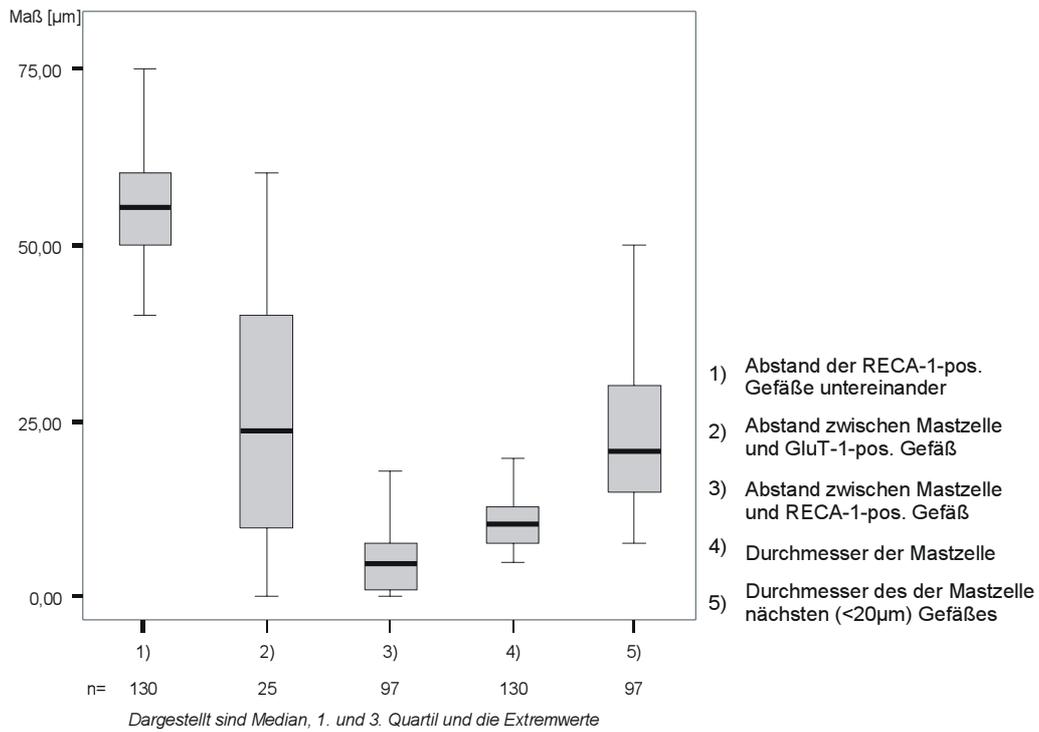


Abb. 3.14: Ermittelte Distanzen und Durchmesser. In der Boxplotdarstellung sind Median, erstes und drittes Quartil sowie die Extremwerte eingezeichnet. Zur klassenweisen Verteilung der einzelnen Werte siehe Abb. 3.11 für den Abstand zwischen Mastzelle und RECA-1-pos. Gefäß und zwischen den RECA-1-pos. Gefäßen, Abb. 3.10 für den Abstand zwischen Mastzelle und GluT-1-pos. Gefäß sowie Abb. 3.12 für das Kaliber des der Mastzelle nächstgelegenen Gefäßes.

3.2.4 Verteilung der Mastzellen über die longitudinale Ganglienachse

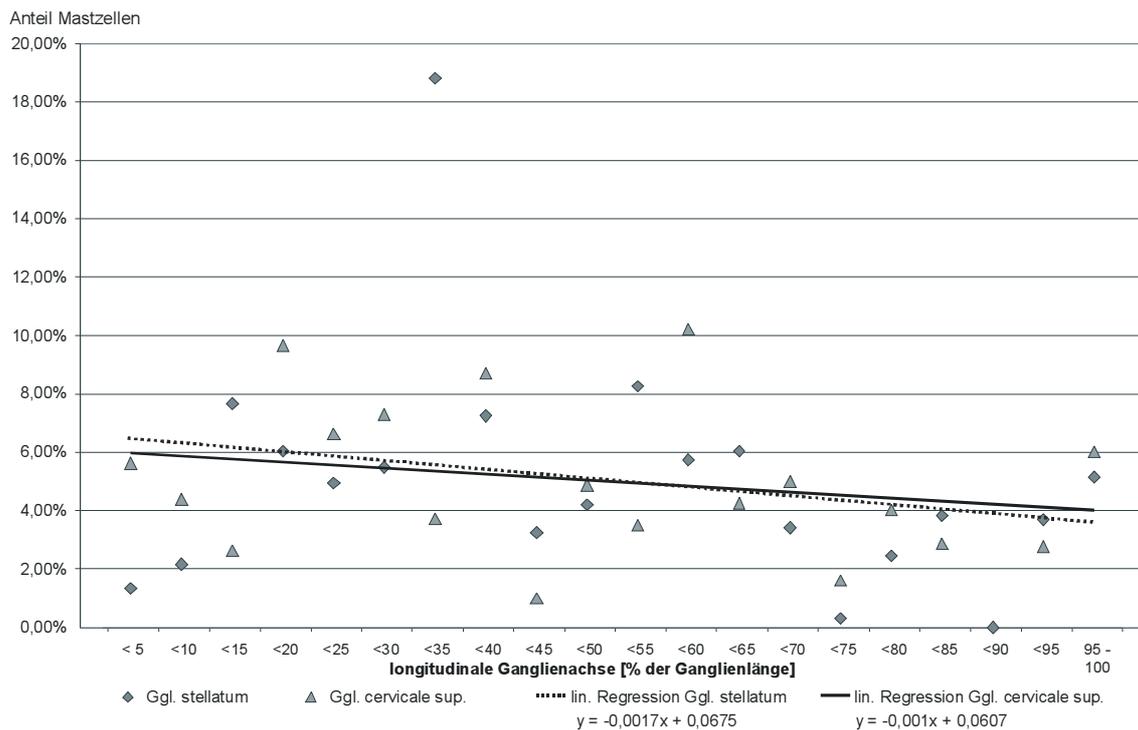


Abb. 3.15: Verteilung der Mastzellen über die longitudinale Ganglienachse. Aufgetragen ist als Häufigkeit der Anteil an Mastzellen einer bestimmten Etage der longitudinalen Ganglienachse an der Gesamtzahl an Mastzellen pro Ganglion (N=250 Mastzellen insgesamt). Die untersuchten 8 Ganglien wurden auf gleiche Länge „gestreckt“, d.h. die Position innerhalb der longitudinalen Ganglienachse in Prozent der jeweiligen Ganglienlänge angegeben. Die longitudinale Ganglienachse wurde ferner in Etagen zu je 5% der Ganglienlänge eingeteilt. Beim Vergleich der einzelnen Werte für das Ganglion cervicale superius (Dreiecke) und das Ganglion stellatum (Rauten) lässt sich keine Bevorzugung der Mastzelle für einen bestimmten Teil der longitudinalen Ganglienachse erkennen; ebenso zeigen die durch die Einzelwerte gelegten Regressionsgeraden keinen deutlichen Abfall oder Anstieg der Mastzellen-Häufigkeit zugunsten einer bestimmten Region (vgl. auch Abb. 3.17: Boxplotdarstellung).

Im folgenden werden die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichung aufgeführt.

Bei den 8 untersuchten Ganglien (jeweils 4 Ganglia cervicalia superiora und stellata) und 250 Mastzellen insgesamt wurden pro Ganglion 31 ± 22 Mastzellen gefunden. Teilt man die longitudinale Ganglienachse jedes Ganglions in drei gleich große Etagen (die beiden Pole und das Zentrum) ein, so findet man in der ersten, kranialen Etage 11 ± 12 Mastzellen, in der zweiten, zentralen Etage 13 ± 9 und in der dritten, kaudalen Etage 7 ± 4 Mastzellen. In der ersten Etage kommen damit $36,0\% \pm 14,0\%$, in der zweiten Etage $42,4\% \pm 17,8\%$ und in der dritten Etage $21,6\% \pm 10,5\%$ aller Mastzellen vor (s. Abb. 3.17).

Statistisch wurden die folgenden Nullhypothesen geprüft:

- Die Grundgesamtheiten der Mastzellzahlen dreier gleich großer Etagen der longitudinalen Ganglienachse unterscheiden sich nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Mastzellzahlen dreier gleich großer Etagen der longitudinalen Ganglienachse unterscheiden sich zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

Die Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests liefert nicht-signifikante Unterschiede zwischen der Grundgesamtheit der Mastzellzahlen der ersten und zweiten Etage ($p=0,39$) sowie zwischen der Grundgesamtheit der Mastzellzahlen der zweiten und dritten Etage ($p=0,33$). Die Nullhypothese a) kann somit nicht abgelehnt werden (vgl. Abb. 3.16).

Der Mann-Whitney-Test zeigt, dass sich die Grundgesamtheit der Mastzellzahlen dreier gleich großer Etagen der longitudinalen Ganglienachse zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht signifikant ($p=0,58$) unterscheidet; die Nullhypothese b) kann ebenfalls nicht abgelehnt werden (s. Abb. 3.16).

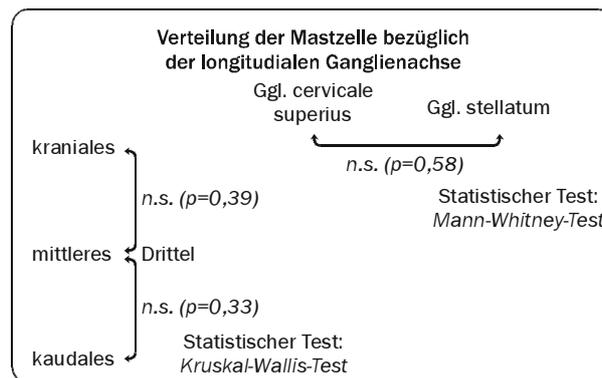


Abb. 3.16: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der statistischen Testung ($N=250$ Mastzellen). Der Kruskal-Wallis-Test zeigt einen nicht-signifikanten (n.s.) Unterschied zwischen den Mastzellzahlen dreier Etagen der longitudinalen Ganglienachse; einen nicht-signifikanten Unterschied zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum bezüglich der Mastzellzahl der drei Etagen liefert der Mann-Whitney-Test.

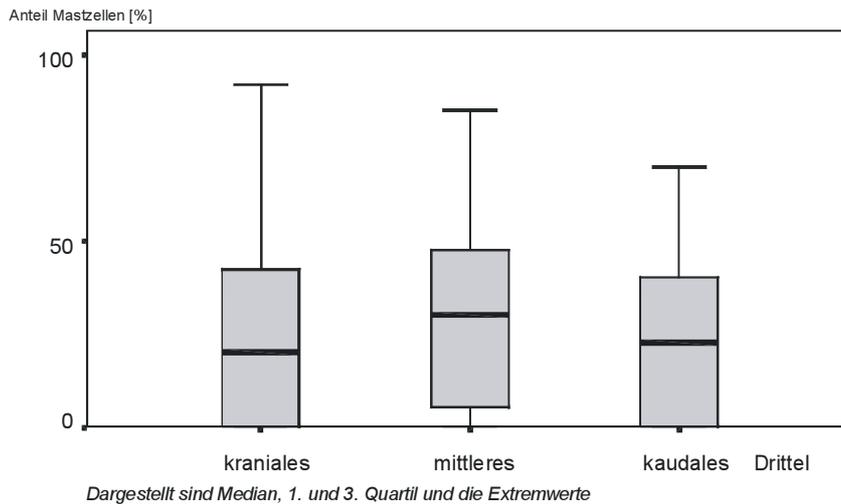


Abb. 3.17: Verteilung der Mastzellen über die longitudinale Ganglienachse. Im Diagramm sind die Messwerte in Form eines Boxplots dargestellt; es sind Median, erstes und drittes Quartil sowie die Extremwerte eingezeichnet (N=250 Mastzellen insgesamt). Zwischen drei gleich großen Etagen der longitudinalen Ganglienachse fällt hinsichtlich der Mastzellenzahl kein deutlicher Unterschied auf.

3.3 Befunde der Versuchsreihe B

3.3.1 Darstellung des Serotoninrezeptors vom Typ 5-HT₃

5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität findet sich an der Circumferenz eines jeden Perikaryons und im Neuronpil. Im Bereich von Nervenfasern zeigt sich eine besonders hohe Intensität der Immunreaktivität (vgl. Abb. 3.18). Das Vorkommen der 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität um die Perikaryen lässt sich wie folgt beschreiben: Zum einen umsäumen die positiven Strukturen unvollständig den Umfang der Perikaryen in Form einer sehr dünnen Linie, deren Dicke höchstens 1 µm beträgt, zum anderen zeigen sich diskrete rund-ovale Anhäufungen der Immunreaktivität an der Circumferenz der Perikaryen, deren Durchmesser 2-3 µm beträgt. Ist der oben beschriebene 5-HT₃-Rezeptor-positive Saum um die Perikaryen vorhanden, so liegen die rezeptorpositiven rund-ovalen Strukturen unmittelbar daran. Bei einigen Perikaryen lässt sich Immunreaktivität im Bereich des Zytoplasmas finden, die zur Zellperipherie hin leicht zunimmt und den Nucleus immer auslässt. Während die beiden zuerst beschriebenen Lokalisationen der 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität sich intensiv und scharf begrenzt zeigen, weisen die 5-HT₃-positiven Strukturen im Zytoplasmabereich eine zum Teil fleckige Fluoreszenz mit deutlich geringerer Intensität auf. Im Bereich von Nervenfasern zeigt sich ein annähernder Parallelverlauf der 5-HT₃-positiven Strukturen mit den Axonen und Dendriten der Neurone. Die 5-HT₃-Rezeptor-positiven Strukturen stellen sich wie am Umfang der

Perikaryen sehr feinfädig dar, sie messen ebenso höchstens 1 μm . Die rund-ovalen, 5-HT₃-rezeptorpositiven Anhäufungen sind hier wesentlich seltener zu finden als im Bereich der Perikaryen. Bezüglich der Verteilung der 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität ergeben sich keine topographischen Unterschiede in der Ganglienlängsachse sowie keine Differenzen zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum.

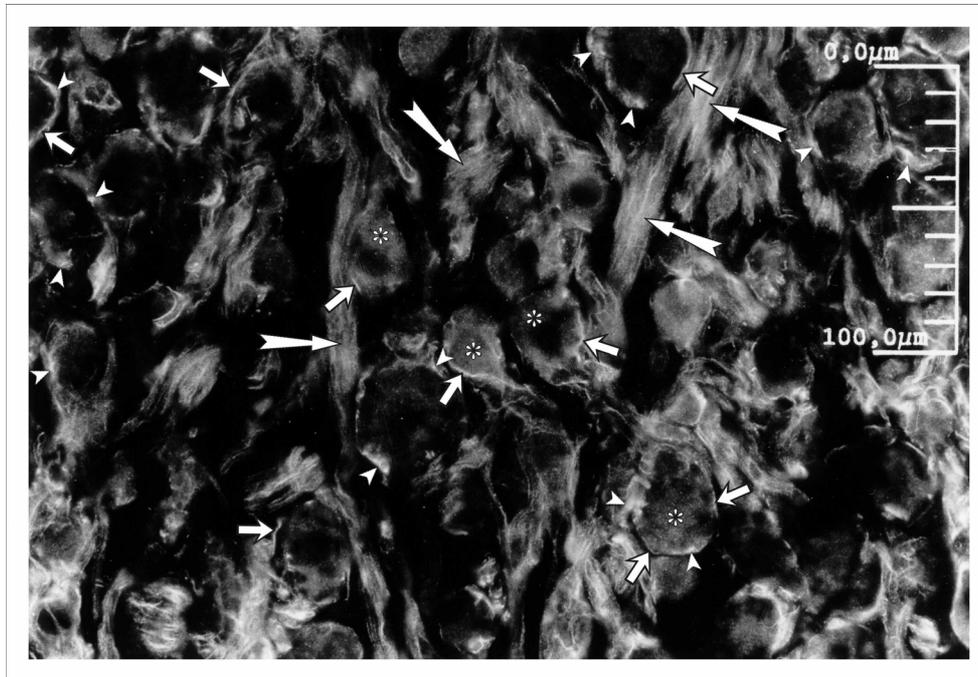


Abb. 3.18: Immunfluoreszenz: Markierung des 5-HT₃-Rezeptors, Ganglion cervicale superius der Ratte. Intensive 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität findet sich im Neuropil (lange Pfeile) und an der Circumferenz der Perikaryen. An der Circumferenz der Perikaryen kommen fadenförmige (kurze Pfeile) und rund-ovale Strukturen (Pfeilspitzen) mit 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität vor. Eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität weisen 5-HT₃-positive Strukturen im Zytoplasmabereich der Perikaryen auf (Sterne).

3.3.2 Darstellung des Serotoninrezeptors vom Typ 5-HT_{2A}

Der 5-HT_{2A}-Rezeptor ist im Ganglion cervicale superius und im Ganglion stellatum der Ratte immunhistochemisch ausschließlich an Gefäßendothelien nachweisbar, und zwar nur bei einem Teil der Gefäße. Besonders Gefäße mit einem Kaliber von 20 μm bis 40 μm zeigen 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunreaktivität (vgl. Abb. 3.19). Bezüglich der Verteilung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren zeigen sich keine topographischen Unterschiede entlang der Ganglienlängsachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum.

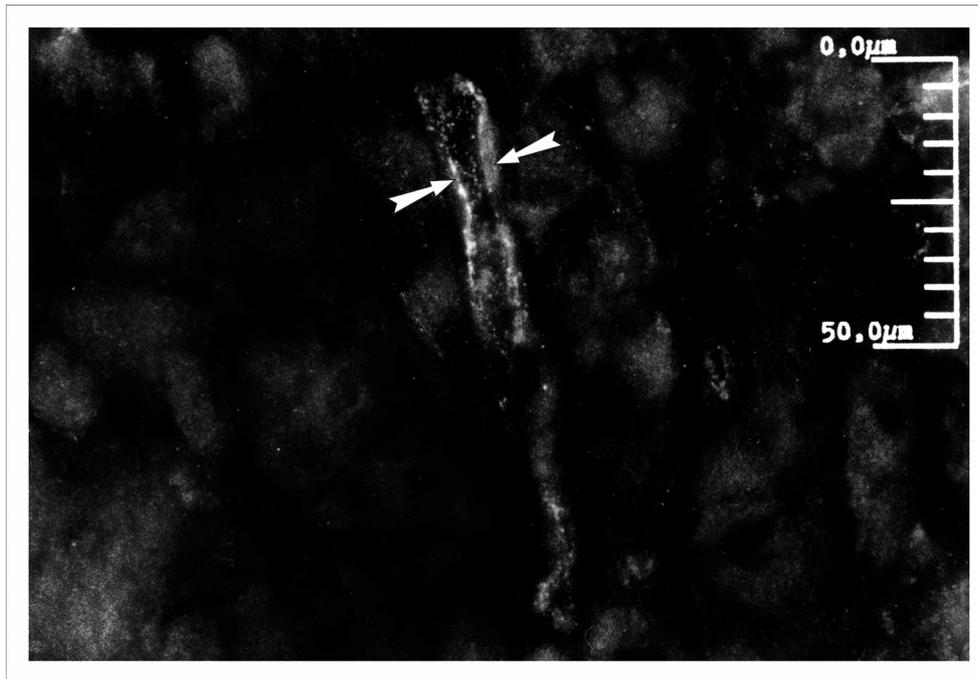


Abb. 3.19: Immunfluoreszenz: Markierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors, Ganglion cervicale superius der Ratte. 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunreaktivität findet sich an der Gefäßwand eines längs geschnittenen, ca. 10 µm dicken Gefäßes (Pfeile).

3.3.3 Doppelmarkierung des 5-HT₃-Rezeptors und VAcHT bzw. des 5-HT₃-Rezeptors und Synaptophysin

Die 5-HT₃-Rezeptoren und die Synapsen waren in allen Präparaten immunhistochemisch darstellbar. Es ergibt sich optisch kein Unterschied zwischen der Synapsendarstellung durch Markierung des VAcHT und von Synaptophysin (vgl. Abb. 3.20).

Die immunhistochemische Synapsendarstellung zeigt an der Circumferenz der Perikaryen und im Neuronil punktförmige, positive Strukturen (vgl. Abb. 3.21); das Muster ihrer Verteilung erscheint regelmäßig. Ebenso lassen sich keine topographischen Unterschiede ihres Vorkommens hinsichtlich der longitudinalen Ganglienachse feststellen. Einzig im Bereich in das Ganglion ein- und austretender Nervenfasern lassen sich keine Synapsen immunhistochemisch aufzeigen.

Eine immunhistochemische Doppelmarkierung der Synapsen und des 5-HT₃-Rezeptors lässt keine Kollokalisationen beider erkennen (s. Abb. 3.22); das trifft sowohl für die Synapsendarstellung durch Markierung des VAcHT und von Synaptophysin als auch für das Ganglion cervicale superius und das Ganglion stellatum zu.

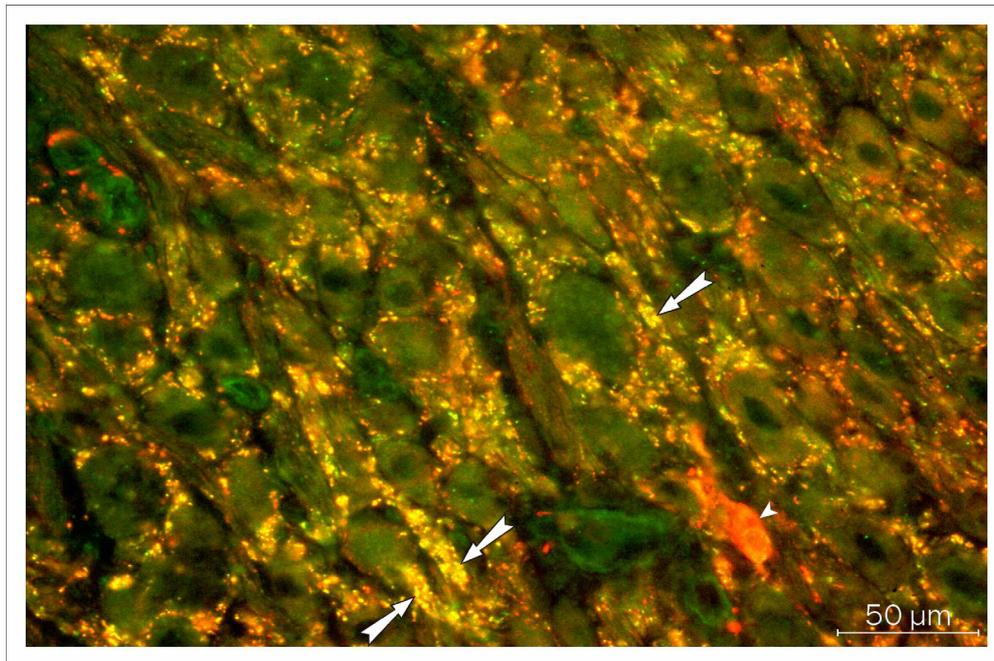


Abb. 3.20: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung des VACHT (FITC, grün) und von Synaptophysin (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Durch Doppelbelichtung erscheinen Kolokalisationen der beiden dargestellten Antigene in der Mischfarbe gelb (Pfeile). Anmerkung: Man beachte die rote Synaptophysin-positive SIF-Zelle (Pfeilspitze).

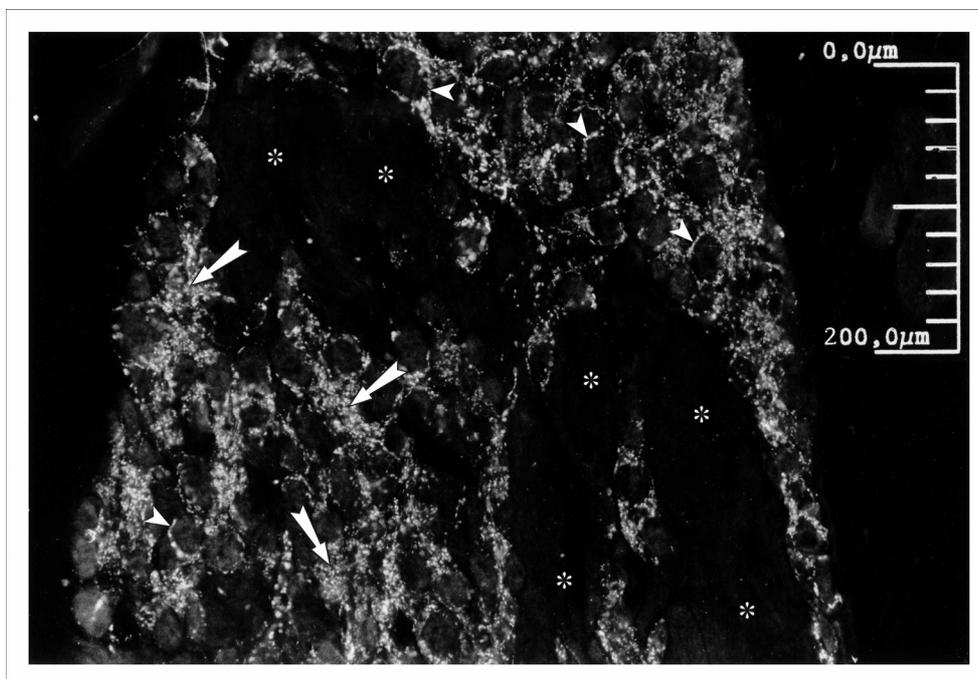


Abb. 3.21: Immunfluoreszenz: Markierung des VACHT, Ganglion cervicale superius der Ratte. VACHT-Immunreaktivität findet sich zirkulär um die Perikaryen (Pfeilspitzen) und im Neuropil (Pfeile). Im Bereich größerer Nervenfaserbündel lassen sich keine Synapsen immunhistochemisch nachweisen (Sterne).

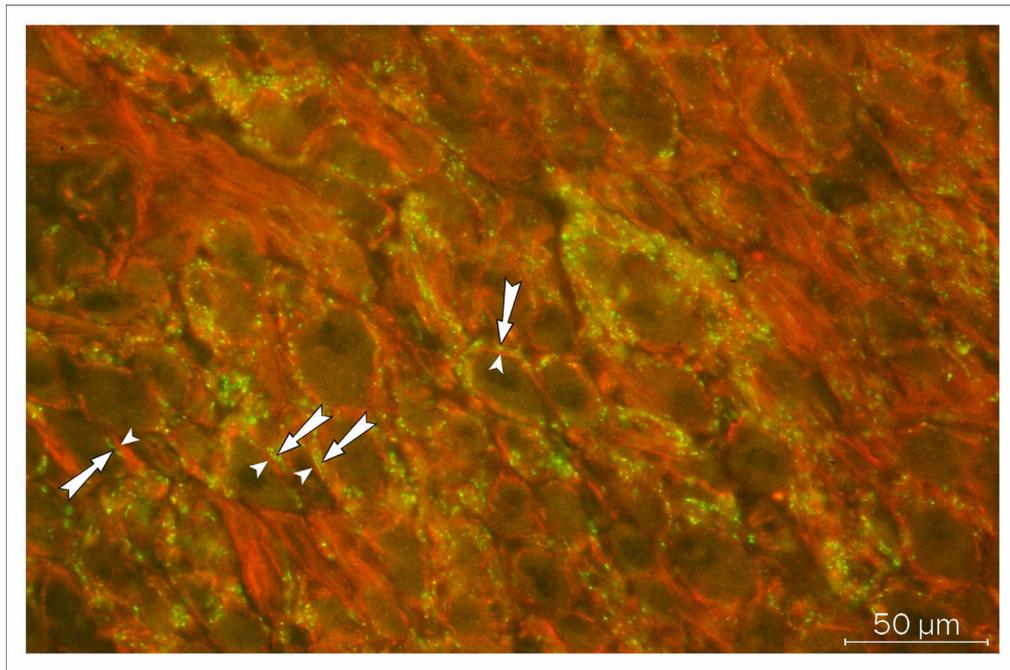


Abb. 3.22: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung des VACHT (FITC, grün) und des 5-HT₃-Rezeptors (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Kolokalisationen (Mischfarbe gelb) sind immunhistochemisch nicht nachweisbar; die VACHT-positiven Strukturen (Pfeile) umgeben zwar die 5-HT₃-Rezeptor-positiven (Pfeilspitzen), sind aber nicht mit diesen identisch.

3.3.4 Doppelmarkierung des 5-HT₃-Rezeptors und PGP 9.5

Durch Markierung der neuronalen Ubiquitinhydrolase „PGP 9.5“ lassen sich sowohl die Perikaryen als auch die Axone und Dendriten der Nervenzellen darstellen. Es ergeben sich hierbei keinerlei Differenzen hinsichtlich Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum sowie der longitudinalen Ganglienachse innerhalb eines Ganglions.

Durch eine Doppelmarkierung von PGP 9.5 und des 5-HT₃-Rezeptors lassen sich Kolokalisationen immunhistochemisch darstellen. Die meisten der dargestellten Serotoninrezeptoren zeigen eine Kolokalisation mit den PGP 9.5-positiven Neuronen an der Circumferenz der Perikaryen und besonders stark im Neuropil (vgl. Abb. 3.23 und 3.24). Einige rund-ovale Stellen (Durchmesser maximal 5 µm) der 5-HT₃-Rezeptor-positiven Strukturen fallen jedoch nicht mit PGP 9.5-positiven Elementen zusammen.

In der Verteilung der Kolokalisation von 5-HT₃-Rezeptor- und PGP 9.5-Immunreaktivität zeigen sich keine topographischen Unterschiede in der Ganglienlängsachse sowie keine Differenzen zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum.

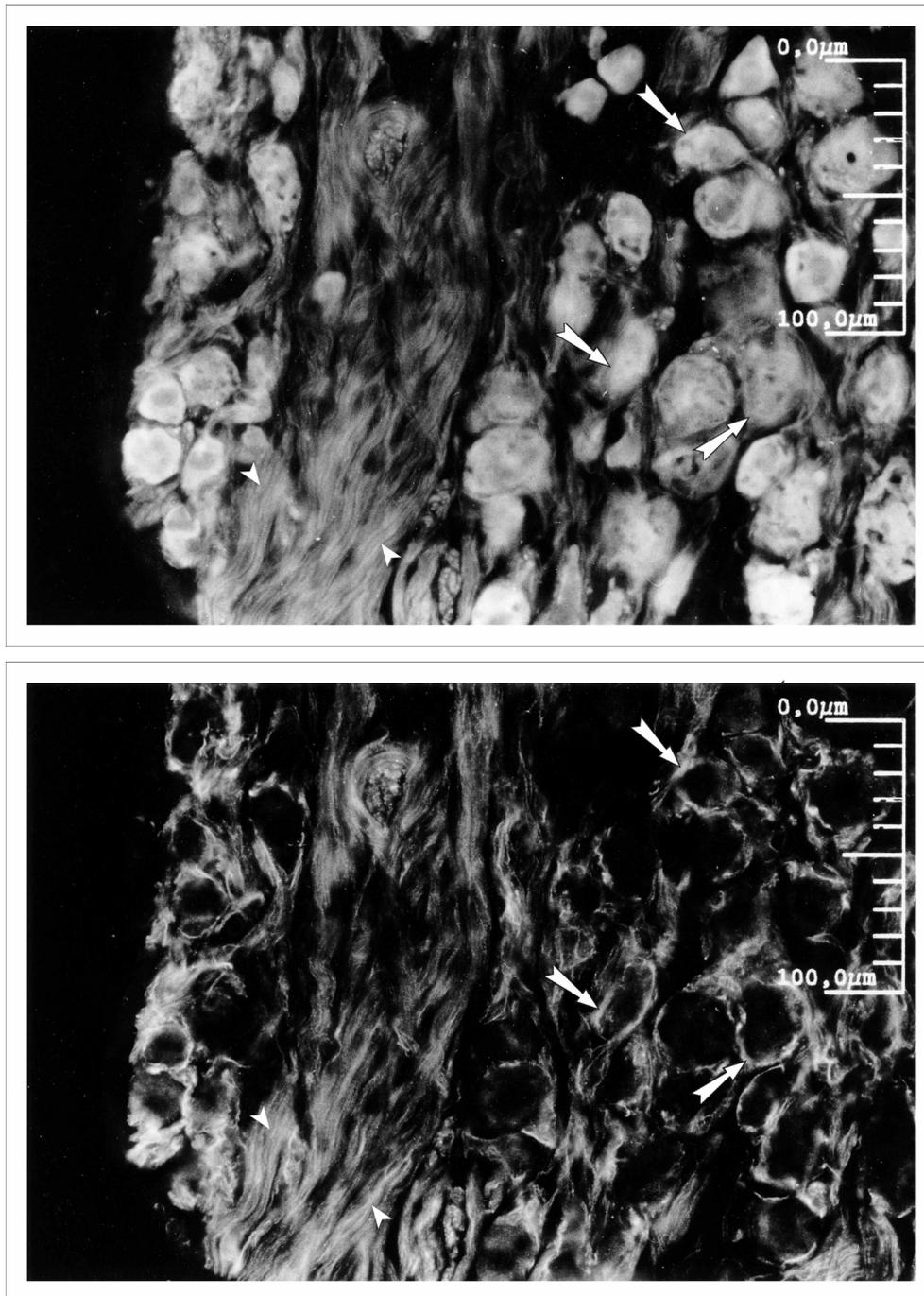


Abb. 3.23a und 3.23b: Doppelimmunfluoreszenz, korrespondierendes Bildpaar. Ganglion cervicale superius der Ratte. **Abb. 3.23a:** Markierung von PGP 9.5, **Abb. 3.23b:** Markierung des 5-HT₃-Rezeptors.

Zu sehen ist ein durch das Ganglion verlaufendes Nervenfaserbündel neben einer Region, die hauptsächlich Perikaryen enthält. Kollokalisierungen der immunhistochemisch dargestellten Neurone und der 5-HT₃-Rezeptoren lassen sich im korrespondierenden Bildpaar an der Circumferenz der Perikaryen (Pfeile) und im Neuropil (Pfeilspitzen) finden. Die Pfeile und Pfeilspitzen entsprechen jeweils identischen Stellen beider Bilder.

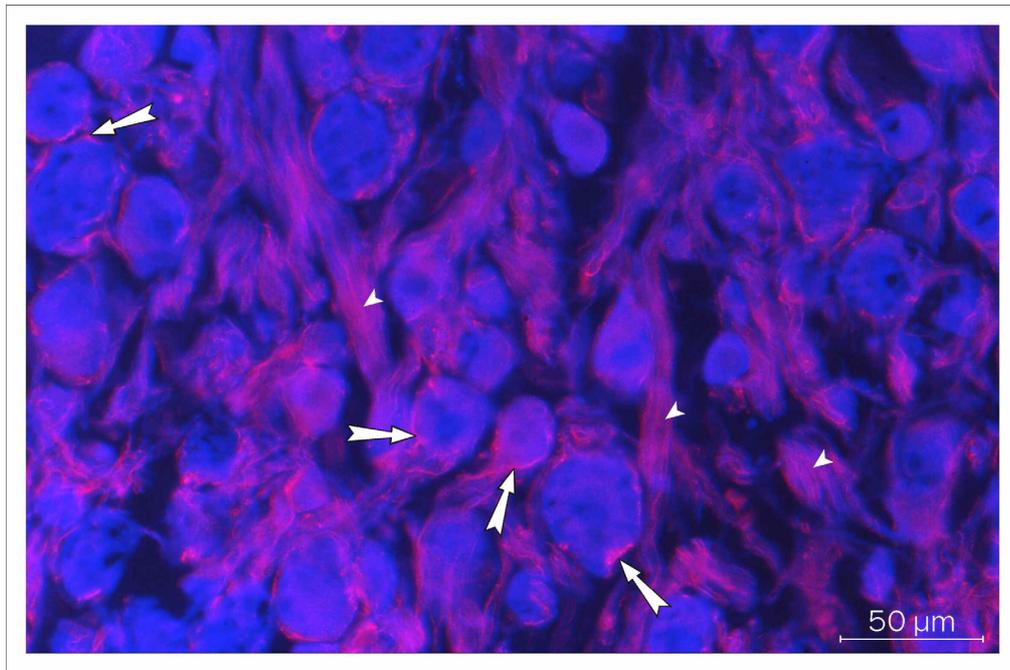


Abb. 3.24: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung von PGP 9.5 (AMCA, violett) und des 5-HT₃-Rezeptors (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Kolokalisationen der 5-HT₃-positiven Strukturen mit den PGP 9.5-positiven Perikaryen stellen sich in der Mischfarbe violett-rosa dar (Pfeile). Dies gilt besonders für die Kolokalisation der 5-HT₃-Rezeptor-positiven Strukturen mit dem Neuropil (Pfeilspitzen).

3.3.5 Doppelmarkierung von 5-HT₃-Rezeptor und Vimentin

Die mit Hilfe von Vimentin als Antigen immunhistochemisch dargestellten Satellitenzellen umkleiden fadenförmig die Perikaryen und zeigen im Bereich des Kerns eine Zunahme ihres Durchmessers. Die Ausläufer der Satellitenzellen sind höchstens 1 µm dick.

Die Vimentin-positiven Satellitenzellen enthalten häufig 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität. An der Circumferenz der Perikaryen der Neurone finden sich viele Stellen, an denen sich die Vimentin-positiven mit den 5-HT₃-Rezeptor-positiven Strukturen gleichzeitig abbilden und somit das Perikaryon einschneiden (vgl. Abb. 3.25). Etwa mit gleicher Häufigkeit zeigen sich am Perikaryenumfang immunhistochemisch Satellitenzellen, die keinen 5-HT₃-Rezeptor tragen, sich aber von den 5-HT₃-Rezeptor-positiven sonst nicht weiter unterscheiden. Gelegentlich lässt sich an der Circumferenz der Perikaryen auch 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität finden, der keine vimentinpositive Struktur zugeordnet werden kann.

In der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum zeigen sich keine Differenzen in der Verteilung der immunhistochemisch dargestellten 5-HT₃-Rezeptoren, Satellitenzellen und deren Kolokalisationen.

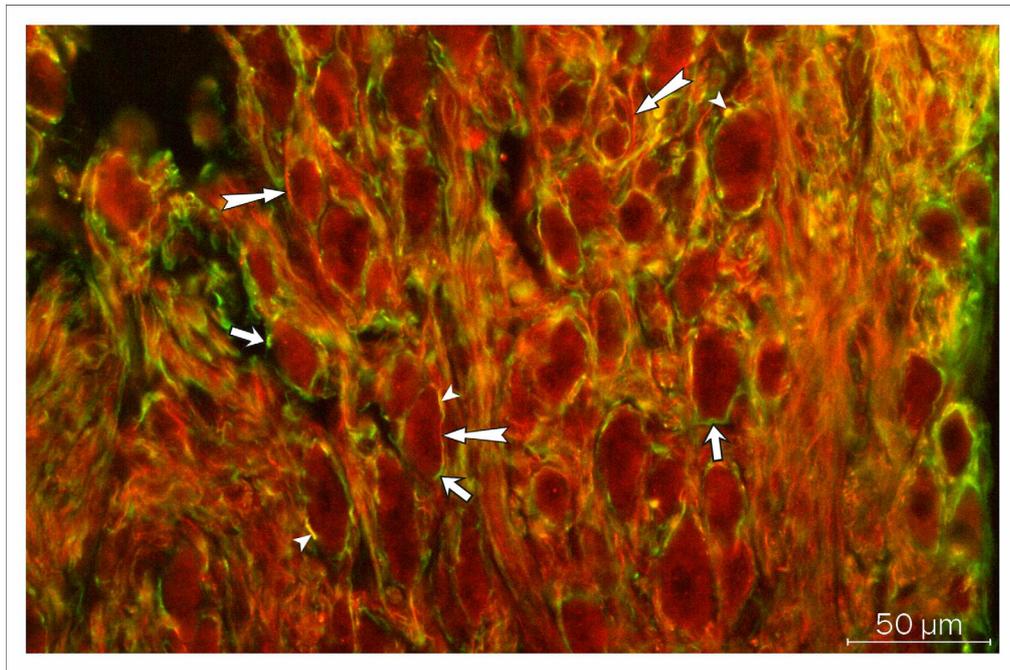


Abb. 3.25: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung von Vimentin (FITC, grün) und des 5-HT₃-Rezeptors (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Man erkennt zahlreiche Kolokalisationen der Vimentin- und 5-HT₃-Rezeptor-Immunität, die in der Mischfarbe gelb erscheinen (Pfeilspitzen). Darüber hinaus existieren Stellen von 5-HT₃-Rezeptor-Immunität (lange Pfeile) ohne Vimentin-positives Korrelat und umgekehrt (kurze Pfeile).

3.3.6 Doppelmakierung von 5-HT_{2A}-Rezeptor und RECA-1

Die Doppelmakierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors und der RECA-1-positiven Gefäßendothelien zeigt, dass sich dieser Typ von Serotoninrezeptor ausschließlich an Endothelien befindet (vgl. Abb. 3.26 und 3.27). Vor allem die dargestellten Endothelien von Gefäßen des Kalibers 20-40 µm weisen eine Kolokalisation mit 5-HT_{2A}-Rezeptor-immunreaktiven Strukturen auf, dickere Gefäße kommen in den untersuchten vegetativen Ganglien selten vor und dünnere Gefäße stellen sich häufiger rezeptornegativ dar. Es existieren zahlenmäßig mehr Gefäße eines Kalibers unter 20 µm, die 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunität besitzen, jedoch steigt der Anteil der rezeptorpositiven Gefäße mit Zunahme des Kalibers an. Unter Einbeziehung der Wandstruktur und des Gefäßkalibers lässt sich das Gros der 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven Gefäße als postkapilläre Venulen identifizieren.

Hinsichtlich der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum zeigen sich keine Unterschiede der Verteilung der 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunität und der Kolokalisation mit den immunhistochemisch markierten Gefäßendothelien.

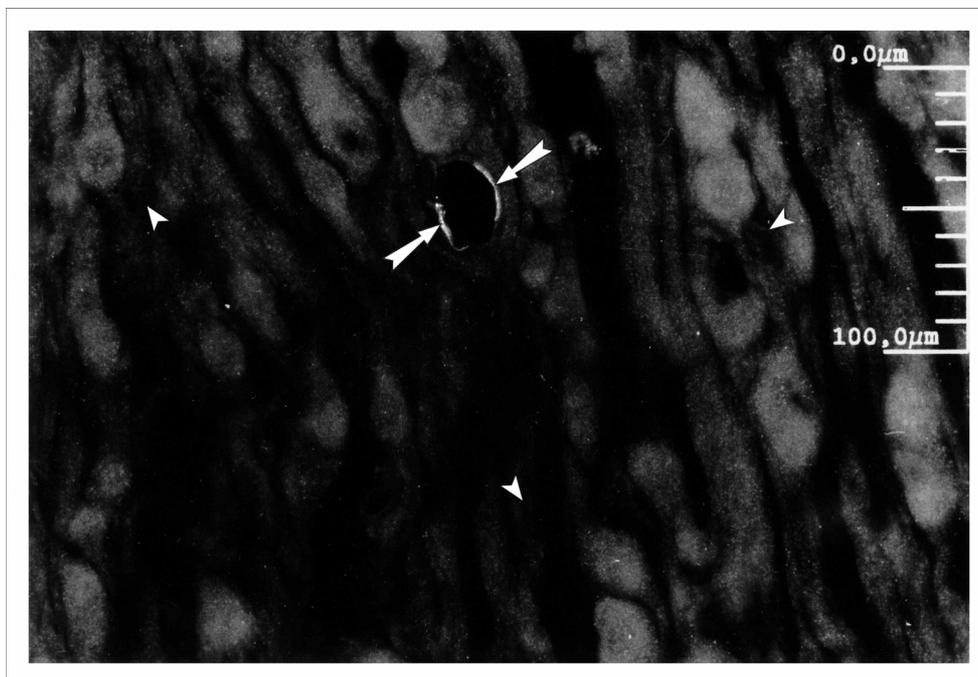


Abb. 3.26a und 3.26b: Doppelimmunfluoreszenz, korrespondierendes Bildpaar. Ganglion cervicale superius der Ratte.

Abb. 3.26a: Markierung von RECA-1, **Abb. 3.26b:** Markierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors.

Man erkennt in Abb. 3.26a die RECA-1-positiven Endothelien von Gefäßen verschiedenen Kalibers (Pfeilspitzen), die alle keine 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunreaktivität aufweisen (Pfeilspitzen in Abb. 3.26b). Das Endothel eines quer geschnittenen Gefäßes mit einem Durchmesser von ca. 25 μm (Pfeile) zeigt als einziges im korrespondierenden Bild 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunreaktivität. Die Pfeile und Pfeilspitzen entsprechen jeweils identischen Stellen beider Bilder.

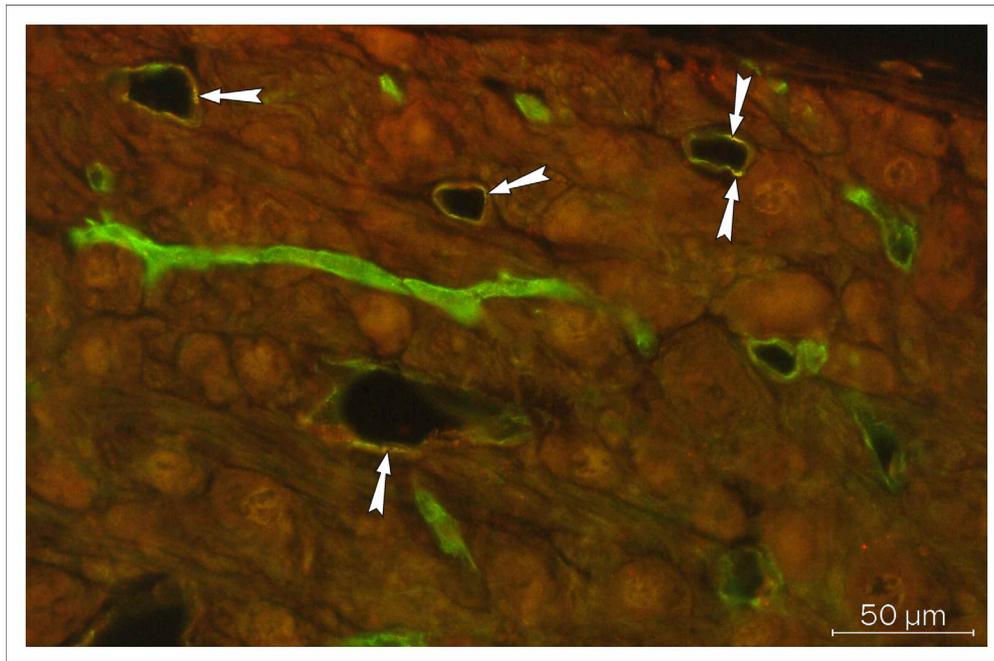


Abb. 3.27: Doppelimmunfluoreszenz: Markierung von RECA-1 (FITC, grün) und des 5-HT_{2A}-Rezeptors (Cy-3, rot), Ganglion cervicale superius der Ratte. Eine Kolokalisation von 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunreaktivität mit den RECA-1-positiven Endothelien stellt sich in der Mischfarbe gelb dar (Pfeile). Es zeigen besonders die Endothelien großkalibriger Gefäße 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunreaktivität; dem langstreckig sichtbaren, längs geschnittenen, dünnen Gefäß fehlt beispielsweise völlig der 5-HT_{2A}-Rezeptor.

3.4 Ergebnisse der elektronischen Bildanalyse: Versuchsreihe B

3.4.1 Doppelmarkierung des 5-HT₃-Rezeptors und VACHT bzw. des 5-HT₃-Rezeptors und Synaptophysin

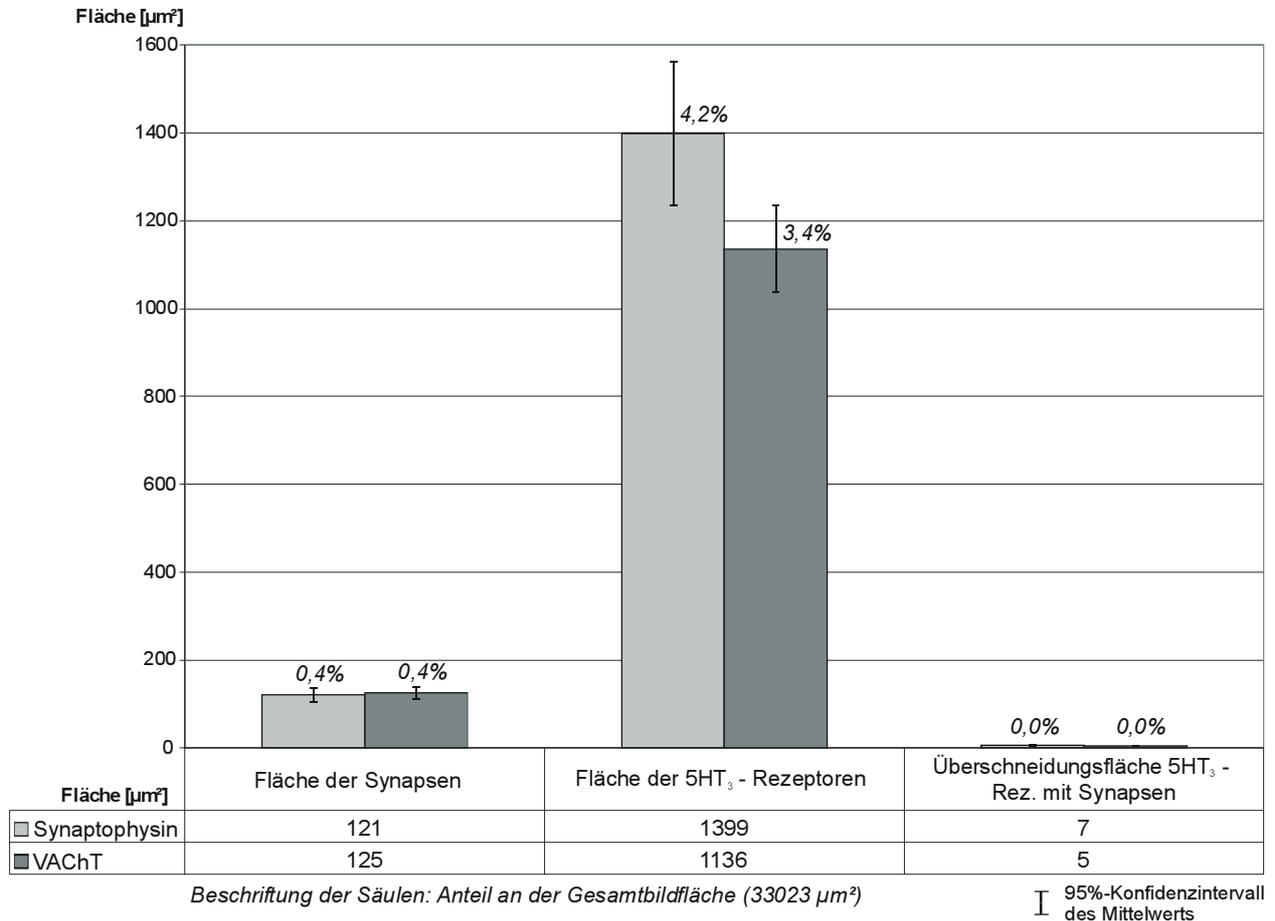


Abb. 3.28: Fläche der Synapsen, der 5-HT₃-Rezeptoren und deren Überschneidungsfläche mit arithmetischem Mittelwert und Vertrauensbereich (N=36 pro Kategorie). Paarweise sind die Ergebnisse für die Synapsenmarkierung durch Antikörper gegen Synaptophysin und VACHT dargestellt; aufgrund zweier getrennter Versuchsreihen wurde auch für die ermittelte 5-HT₃-Rezeptorenfläche und die Überschneidungsfläche die paarweise Darstellung gewählt. Die Flächen haben als Bezugsgröße die ausgewertete Bildfläche von 33023 μm^2 .

Im folgenden werden die Messergebnisse der elektronischen Bildanalyse in Form von Mittelwerten mit Standardabweichung aufgeführt (vgl. dazu Abb. 3.28 und 3.29 sowie im Anhang Tabelle 6a und 6b). Zur Darstellung der Messwerte in Form eines Boxplots siehe Abb. 3.32.

Als durchschnittliche Fläche der mit VACHT markierten Synapsen ergeben sich $125 \pm 43 \mu\text{m}^2$, die Fläche der mit Synaptophysin markierten beträgt $121 \pm 49 \mu\text{m}^2$ pro Bildfläche von 33023 μm^2 . Die Serotoninrezeptoren des Typs 5-HT₃ nehmen eine Fläche von $1267 \pm 402 \mu\text{m}^2$ je Bild ein. Die Synapsen beanspruchen

bei Markierung des VACHT $0,9\% \pm 1,3\%$ und bei Darstellung von Synaptophysin $0,5\% \pm 0,5\%$ der Gesamtfläche; die 5-HT₃-Rezeptorenfläche umfasst $3,8\% \pm 1,2\%$ der Gesamtfläche.

Die Schnittfläche der Synapsen mit den Serotoninrezeptoren beträgt bei Markierung des VACHT $5 \pm 3 \mu\text{m}^2$, bei Darstellung von Synaptophysin $7 \pm 5 \mu\text{m}^2$ pro Bildfläche. Diese Schnittflächen entsprechen für den VACHT $4,4\% \pm 2,0\%$ der Synapsenfläche und $0,5\% \pm 0,3\%$ der Serotoninrezeptorenfläche; für die Darstellung von Synaptophysin $5,6\% \pm 4,1\%$ der Synapsenfläche und $0,5\% \pm 0,3\%$ der 5-HT₃-Rezeptorenfläche.

Auf der Gesamtbildfläche von $33023 \mu\text{m}^2$ waren mittels Antikörper gegen VACHT 89 ± 37 Synapsen und über Markierung von Synaptophysin 84 ± 32 Synapsen darstellbar; die Fläche einer Synapse betrug $1 \pm 0 \mu\text{m}^2$ bzw. $2 \pm 1 \mu\text{m}^2$. Bei Markierung des VACHT fanden sich 4 ± 2 und bei Darstellung von Synaptophysin 5 ± 5 Synapsen, die eine Überschneidung mit 5-HT₃-Rezeptoren aufweisen. Hinsichtlich ihrer Fläche beanspruchen die Synapsen bei Darstellung des VACHT $11,3\% \pm 3,4\%$ und bei Markierung von Synaptophysin $9,3\% \pm 4,2\%$ der Serotoninrezeptorenfläche.

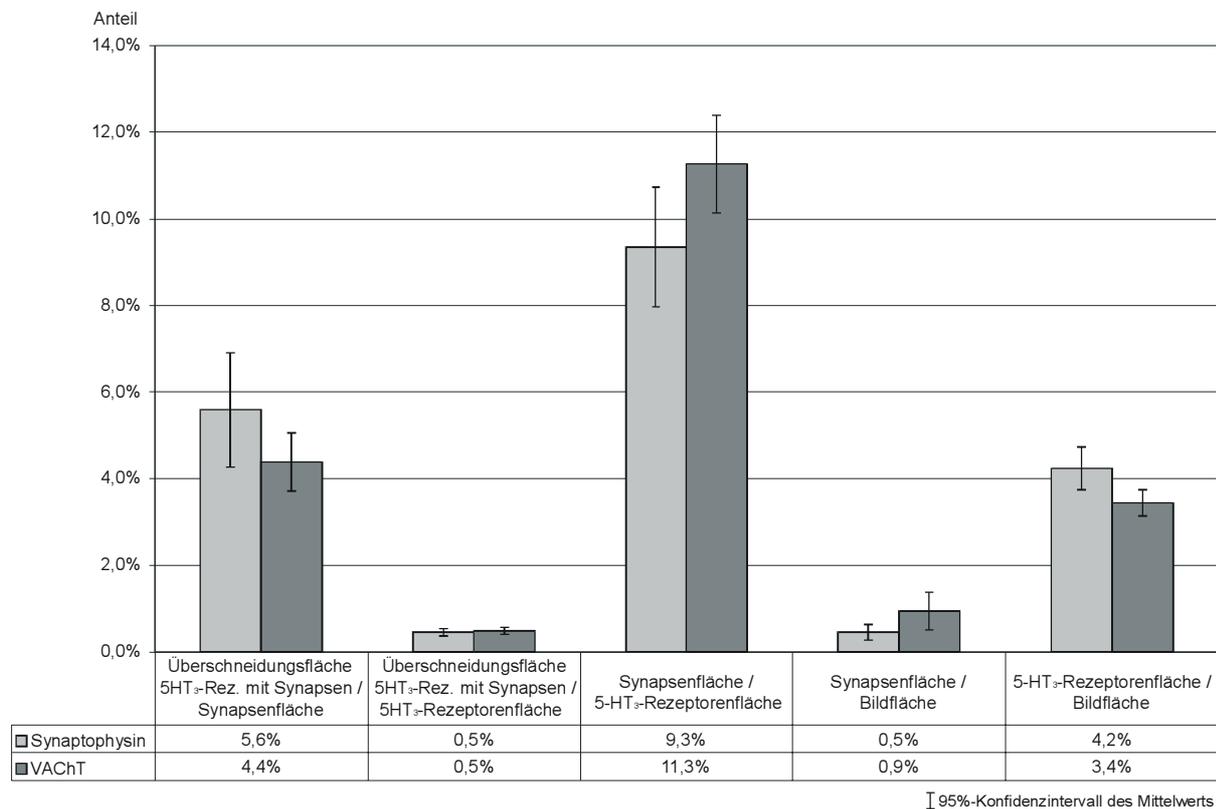


Abb. 3.29: Graphische Darstellung ermittelter Anteile mit Vertrauensbereich (N=36 pro Kategorie). Die Ergebnisse sind für die beiden Versuchsreihen der Markierung von Synaptophysin und VACHT paarweise dargestellt. Man erkennt die geringen Anteile der Überschneidungsfläche zwischen den jeweils dargestellten Synapsen und den 5-HT₃-Rezeptoren an der Synapsen- und 5-HT₃-Rezeptorenfläche. Für die Ausgangswerte der berechneten Anteile siehe Abb. 3.28 bzw. Tab. 6a und 6b im Anhang.

Statistisch wurden die folgenden Nullhypothesen geprüft:

- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Synapsenfläche, 5-HT₃-Rezeptorenfläche und deren Überschneidungsfläche unterscheiden sich jeweils bei der immunhistochemischen Synapsendarstellung durch Markierung von VACHT und Synaptophysin nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Synapsenfläche und der Überschneidungsfläche zwischen Synapsen und 5-HT₃-Rezeptoren unterscheiden sich nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Synapsenfläche, 5-HT₃-Rezeptorenfläche und deren Überschneidungsfläche unterscheiden sich über drei Etagen der longitudinalen Ganglienachse nicht.
- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Synapsenfläche, 5-HT₃-Rezeptorenfläche und deren Überschneidungsfläche unterscheiden sich zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

Bezüglich der Synapsendarstellung durch Markierung des VACHT und von Synaptophysin ergibt die Anwendung des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests für die Messparameter „Synapsenfläche“, „5-HT₃-Rezeptorenfläche“ und deren „Überschneidungsfläche“ jeweils nicht-signifikante Werte, d. h. die Nullhypothese, die Messwerte der jeweiligen Parameter entstammen gleichen Grundgesamtheiten für die beiden Arten der Synapsenmarkierung, kann nicht verworfen werden (vgl. Abb. 3.30). Der Unterschied zwischen den Markierungsarten ist also für alle drei Parameter als „nicht signifikant“ zu betrachten. Dagegen kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ als statistisch gesichert gelten, dass die Synapsenfläche und die Überschneidungsfläche zwischen Synapsen und 5-HT₃-Rezeptoren verschiedenen Grundgesamtheiten entstammen, d. h. sich signifikant voneinander unterscheiden (vgl. Abb. 3.30 und 3.32).

Markierung von Synapse (VACHT bzw. Synaptophysin) und Serotoninrezeptor 5-HT ₃		
Markierung von	VACHT	Synaptophysin
Synapsen	n.s. ($p=0,66$)	
Rezeptoren	n.s. ($p=0,33$)	
Überschneidung	n.s. ($p=0,31$)	
Synapsenfläche	Überschneidung Synapsen - 5-HT ₃ -Rezeptoren	
	* ($p < 0,01$)	
	Statistischer Test: Mann-Whitney-Test	

Abb. 3.30: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der statistischen Testung einer Äquivalenz der immunhistochemischen Synapsenmarkierung durch VACHT und Synaptophysin und der Kolo-kalisation von Synapsen mit 5-HT₃-Rezeptoren (jeweils N=36). Zur Anwendung kam jeweils der nichtparametrische Mann-Whitney-Test zum Vergleich zweier Grundgesamtheiten. Ein möglicher Unterschied zwischen der Synapsendarstellung durch Markierung von VACHT und Synaptophysin erweist sich beim jeweiligen

Vergleich der Messparameter Synapsenfläche, 5-HT₃-Rezeptorenfläche und deren Überschneidungsfläche als nicht signifikant (n.s.). Dagegen zeigt sich zwischen der Synapsenfläche und der Überschneidungsfläche mit den 5-HT₃-Rezeptoren ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) ($N=72$).

Eine statistische Analyse der Messdaten bezüglich der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum ergibt folgendes Resultat. Zwischen den Grundgesamtheiten der jeweiligen Messwerte lässt sich hinsichtlich dreier Etagen der longitudinalen Ganglienachse kein signifikanter Unterschied finden (vgl. Abb. 3.31). Hierzu wurden die Daten dreier Schnittiefen (Mitte des Ganglions und die beiden Pole) bezüglich Mittelwert und Streuung verglichen. Ebenso kann die Nullhypothese einer Übereinstimmung der Messdaten zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht verworfen werden.

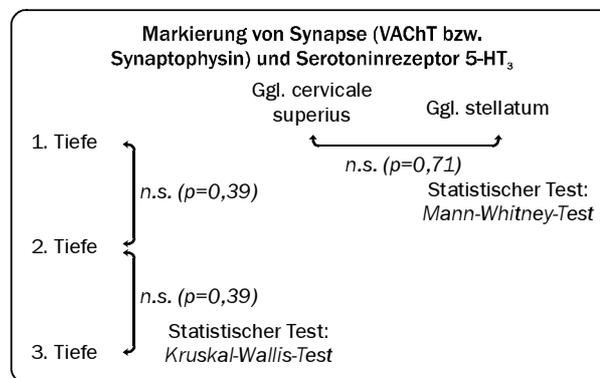


Abb. 3.31: Gezeigt ist das Ergebnis der statistischen Testung bezüglich möglicher Unterschiede der Messparameter über die longitudinale Ganglienachse und zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum ($N=72$). Bei ersterem kam der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test und bei letzterem der Mann-Whitney-Test zum Vergleich dreier bzw. zweier Grundgesamtheiten zur Anwendung. Ein möglicher Unterschied der Messparameter über die longitudinale Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum erweist sich jeweils als nicht signifikant (n.s.).

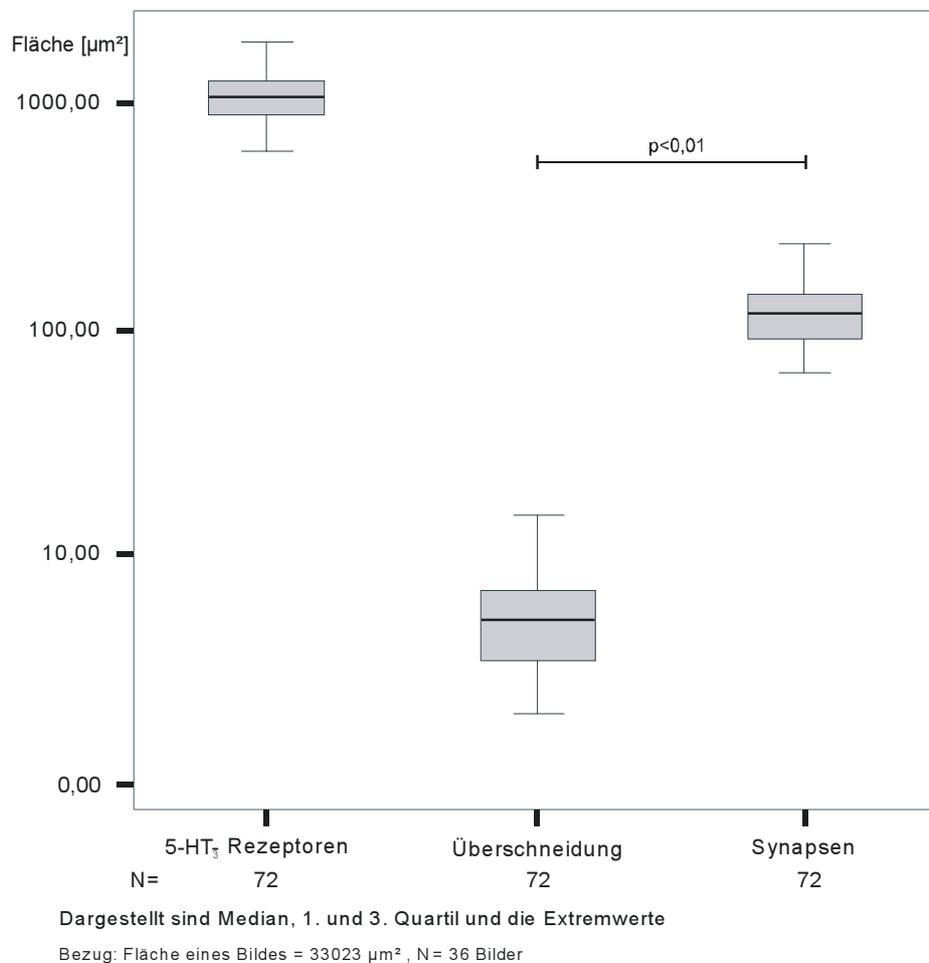


Abb. 3.32: Fläche der Synapsen, der 5-HT₃-Rezeptoren und deren Überschneidungsfläche in Form eines Boxplots in logarithmischer Darstellung; hierbei sind Median, erstes und drittes Quartil und die Extremwerte eingezeichnet. Man erkennt den deutlichen Unterschied zwischen dem Wertebereich der Synapsenfläche und der Überschneidungsfläche der Synapsen mit den 5-HT₃-Serotoninrezeptoren. Des weiteren ist als Ergebnis der statistischen Testung der signifikante Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der Synapsenfläche und der Überschneidungsfläche der Synapsen mit den 5-HT₃-Serotoninrezeptoren eingezeichnet.

3.4.2 Doppelmarkierung des 5-HT₃-Rezeptors und PGP 9.5

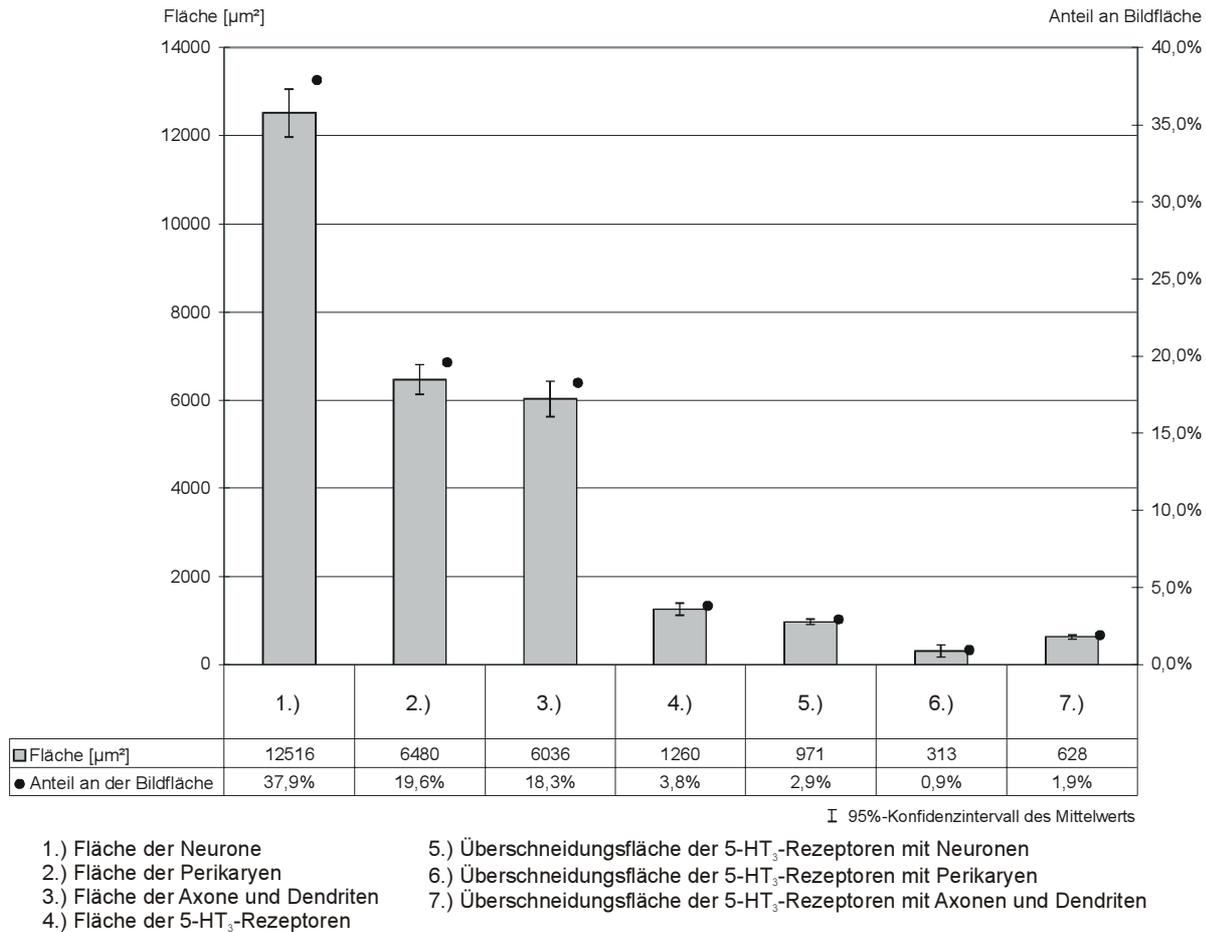


Abb. 3.33: Arithmetische Mittelwerte mit Vertrauensbereich der Fläche der Neurone, Perikaryen und der Axone und Dendriten sowie deren Überschneidungsfläche mit 5-HT₃-Rezeptoren (N=36 je Kategorie). Die Säulen stellen die gemessenen Flächen, die sich auf eine ausgewertete Bildfläche von 33023 µm² beziehen, dar; mit Punkten (●) ist der jeweilige Anteil der gemessenen Flächen an der Bildfläche auf einer Sekundärachse eingezeichnet. Man erkennt, dass ein großer Teil der dargestellten 5-HT₃-Rezeptoren flächenmäßig mit Neuronen zusammentrifft.

Im folgenden werden die Messergebnisse der elektronischen Bildanalyse in Form von Mittelwerten mit Standardabweichung aufgeführt (vgl. dazu Abb. 3.33 und 3.34 sowie im Anhang Tabelle 7). Eine Boxplotdarstellung der Messergebnisse liefert Abb. 3.36.

Die Gesamtfläche der Neurone beträgt 12516±1673 µm² auf einer Gesamtbildfläche von 33023 µm², das entspricht 37,9%±5,1%. Von dieser Neuronenfläche entfallen 6480±1036 µm² (entsprechend 51,9%±5,8% der Neuronenfläche) auf die Perikaryen und 6036±1242 µm² (entsprechend 48,1%±5,8% der Neuronenfläche) auf die Axone und Dendriten. Die Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Neuronen beträgt 971±415 µm², das sind 7,8%±2,9% der Neuronenfläche. Die 5-HT₃-Rezeptoren

schneiden sich mit den Perikaryen auf einer Fläche von $313 \pm 140 \mu\text{m}^2$ und mit den Axonen und Dendriten auf $628 \pm 193 \mu\text{m}^2$, das entspricht $5,1\% \pm 2,7\%$ der Perikaryenfläche bzw. $10,9\% \pm 3,6\%$ der Axon- und Dendritenfläche. Die 5-HT₃-Rezeptoren nehmen $1260 \pm 407 \mu\text{m}^2$ insgesamt pro Bild ein, ein Anteil von $3,7\% \pm 1,3\%$ an der Gesamtbildfläche. Das Verhältnis der Rezeptorenfläche an den Perikaryen zur Fläche der Rezeptoren an den Axonen bzw. Dendriten beträgt $0,49 \pm 0,12$. Es werden 11 ± 3 Neurone pro Gesamtbildfläche gefunden, davon sind 10 ± 3 oder $97,1\% \pm 4,8\%$ 5-HT₃-Rezeptor-positiv.

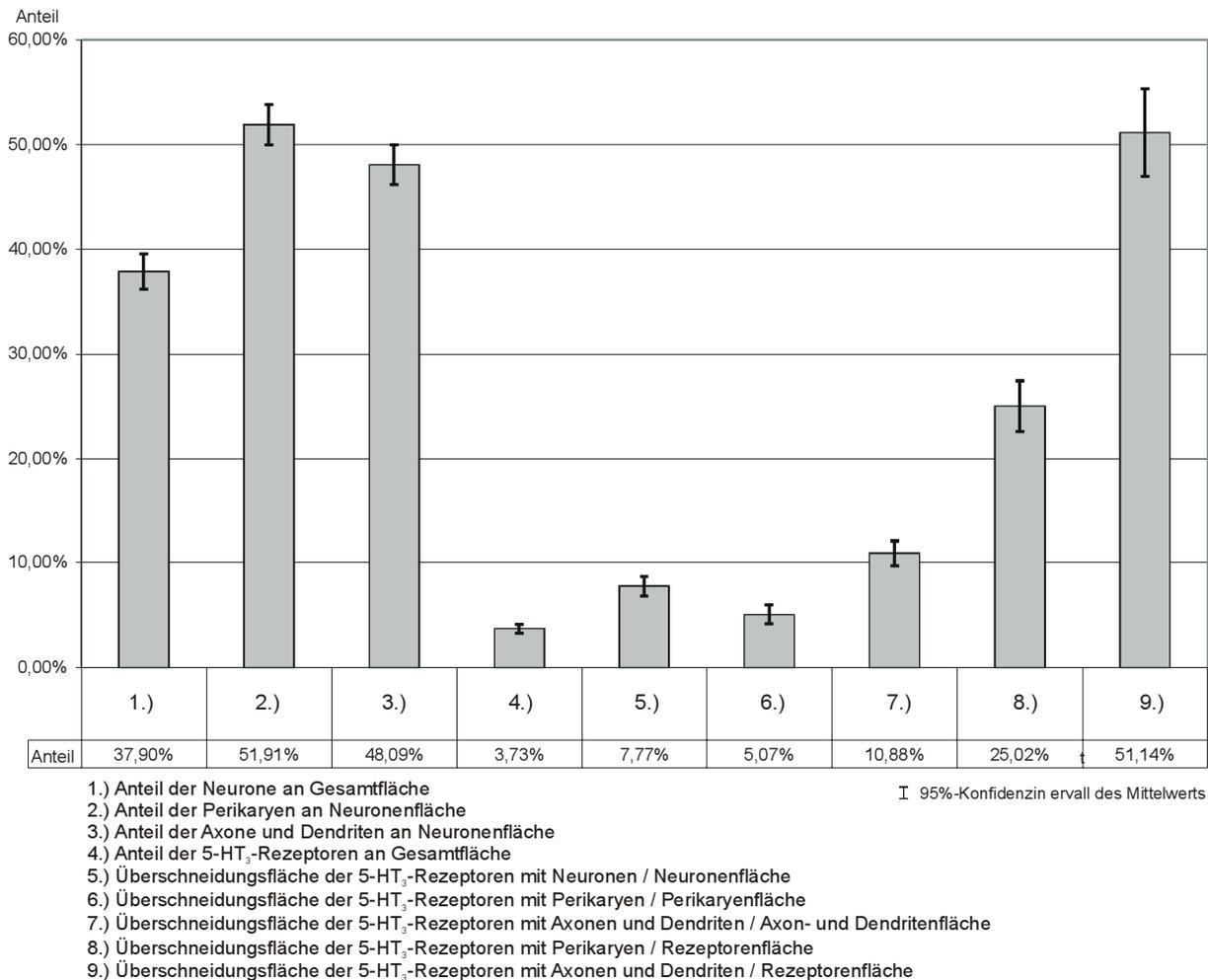


Abb. 3.34: Graphische Darstellung ermittelter Anteile mit Vertrauensbereich (N=36 je Kategorie). Während die Neuronenfläche sich gleichermaßen auf Perikaryen sowie Axone und Dendriten verteilt, ist die Überschneidungsfläche der 5-HT₃-Rezeptoren mit den Axonen und Dendriten etwa doppelt so groß wie die mit den Perikaryen. Für die Ausgangswerte der berechneten Anteile siehe Abb. 3.33 bzw. Tab. 7 im Anhang.

Statistisch wurden die folgenden Nullhypothesen geprüft:

- Die Grundgesamtheiten der Messparameter „Fläche der Neurone“, „Fläche der Perikaryen“, „Fläche der Axone und Dendriten“, „Fläche der 5-HT₃-Rezeptoren“, „Überschneidungsflächen der 5-HT₃-Rezeptoren mit Neuronen, mit Perikaryen und mit Axonen und Dendriten“ unterscheiden sich über drei Etagen der longitudinalen Ganglienachse nicht.

- Die Grundgesamtheiten der genannten Messparameter unterscheiden sich zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

Es lässt sich die Nullhypothese einer Übereinstimmung der Grundgesamtheiten der jeweiligen Messwerte sowohl hinsichtlich der longitudinalen Ganglienachse als auch bezüglich Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht verwerfen (vgl. Abb. 3.35).

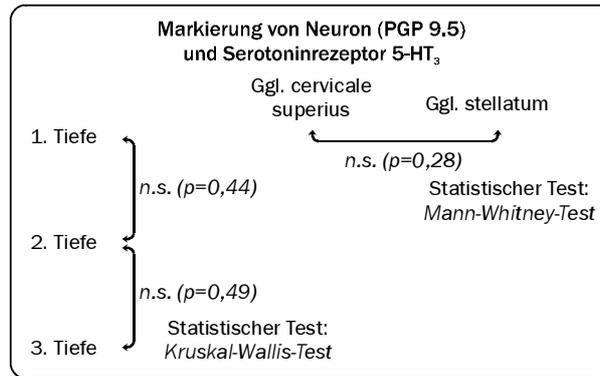


Abb. 3.35: Zu sehen ist das Ergebnis der statistischen Testung bezüglich möglicher Unterschiede der Meßparameter über die longitudinale Ganglienachse und zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum (N=36). Bei ersterem kam der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test und bei letzterem der Mann-Whitney-Test zum Vergleich dreier bzw. zweier Grundgesamtheiten zur Anwendung. Ein möglicher Unterschied der Messparameter über die longitudinale Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum erweist sich jeweils als nicht signifikant (n.s.).

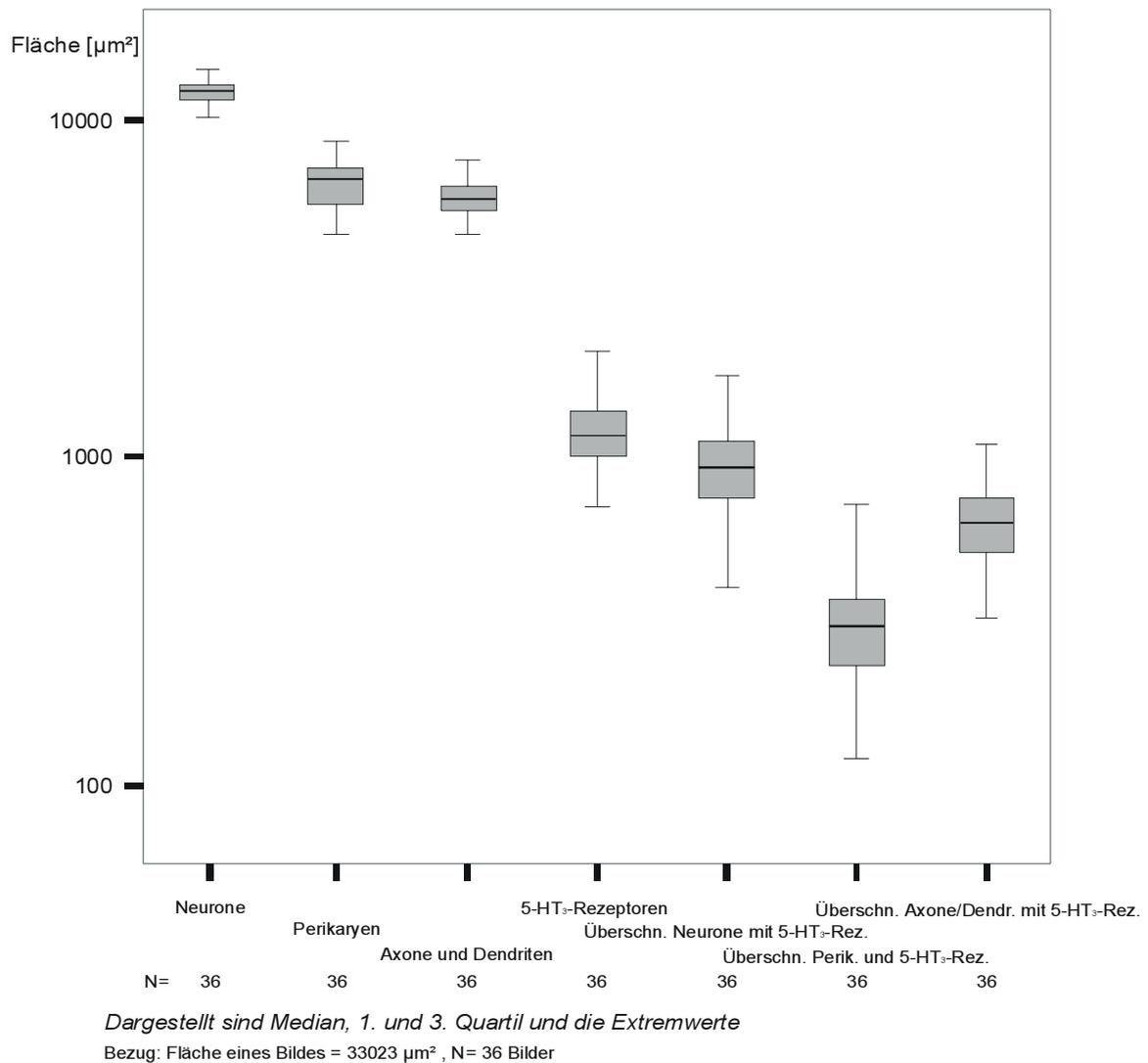


Abb. 3.36: Zu sehen ist die Fläche der Neurone, der Perikaryen, der Axone und Dendriten sowie deren Überschneidungsflächen mit 5-HT₃-Rezeptoren und die Fläche der Serotoninrezeptoren selbst in Form eines Boxplots mit logarithmischer Skalierung; hierbei sind Median, erstes und drittes Quartil und die Extremwerte eingezeichnet. Es zeigt sich im Diagramm, dass sich die Gesamtfläche der Neurone etwa zu gleichen Teilen aus der Fläche der Perikaryen und der Axone und Dendriten zusammensetzt, jedoch die flächenmäßige Besetzung der Neuronenfortsätze mit Serotoninrezeptoren etwa doppelt so groß ist wie die Ausstattung der Perikaryen mit den Rezeptoren.

3.5 Ergebnisse der manuellen Bildauswertung der Versuchsreihe B: Doppelmarkierung von 5-HT_{2A}-Rezeptor und RECA-1

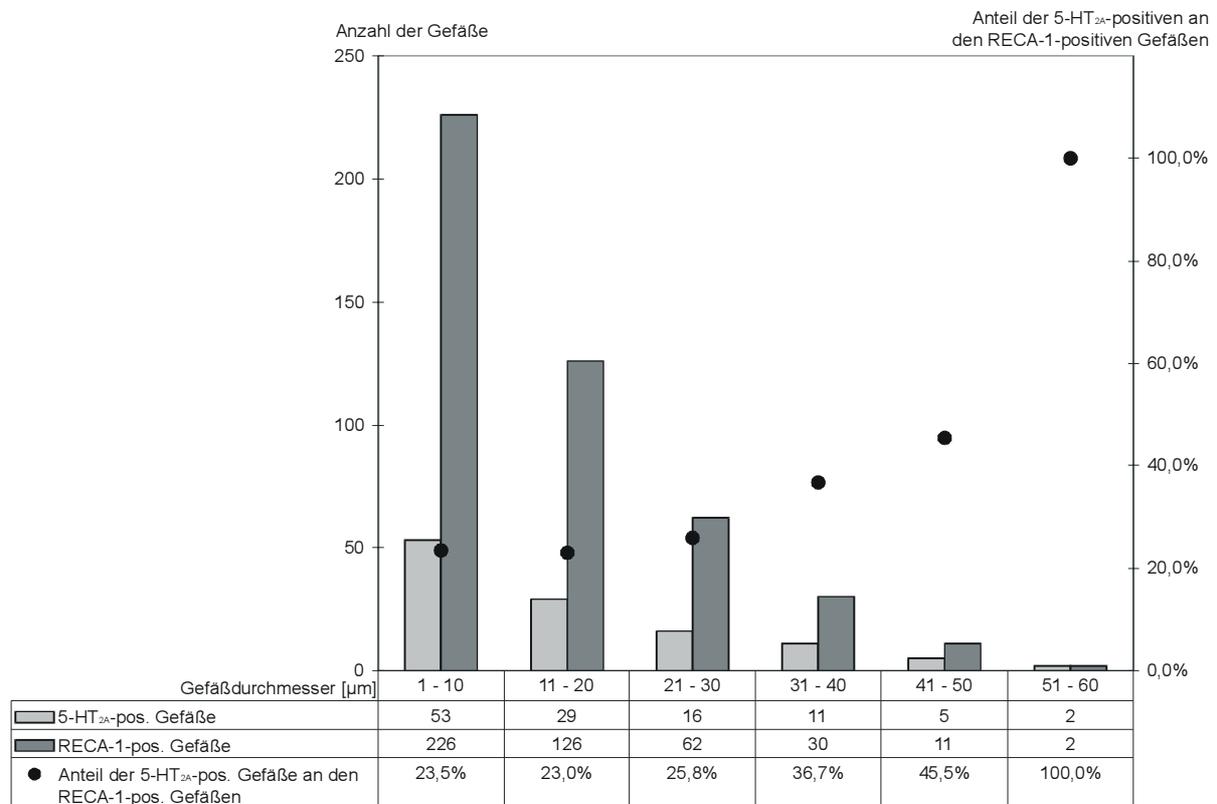


Abb. 3.37: Graphische Darstellung der absoluten Häufigkeiten von Gefäßen verschiedener Kaliberklassen (N=36 Bilder). Paarweise sind die Häufigkeiten der Gefäße als Säulen eingezeichnet, die sich jeweils immunhistochemisch durch Markierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors und von RECA-1 darstellen lassen. Auf der Sekundärachse (Punkte ●) findet sich der Anteil der 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven an den RECA-1-positiven Gefäßen; mit zunehmendem Gefäßkaliber steigt dieser Anteil an.

Im folgenden werden die Messergebnisse der Bildvermessung in Form von Mittelwerten mit Standardabweichung aufgeführt (vgl. dazu Abb. 3.37 sowie im Anhang Tabelle 8). Eine Boxplotdarstellung der Messergebnisse liefert Abb. 3.40.

Die Anzahl der RECA-1-positiven Gefäße betrug 13 ± 4 pro Schnittfläche von $33023 \mu\text{m}^2$, die Zahl der 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven 3 ± 1 ; das entspricht einem Anteil von $0,26 \pm 0,10$. Bei 2 ± 1 von den insgesamt 3 ± 1 5-HT_{2A}-positiven Gefäßen (anteilmäßig $0,67 \pm 0,24$) war mehr als die Hälfte ihres Umfangs mit Serotoninrezeptoren besetzt.

In der Kaliberklasse bis 10 μm Durchmesser waren 45,7% der 5-HT_{2A}-positiven Gefäße und 49,4% der RECA-1-positiven Gefäße vertreten, in der folgenden Klasse von 11 bis 20 μm 25% bzw. 28%. In der Klasse von 41 bis 50 μm kommen bei den 5-HT_{2A}-positiven Gefäßen nur 4,3% und bei den RECA-1-positiven 2,4% der jeweiligen Gefäße vor. Die größte vertretene Klasse für beide Markierungen der Gefäße reicht bis 60 μm ; hier finden sich 1,7% bzw. 0,4% der jeweils dargestellten Gefäße. Gefäße mit Durchmesser Größer als 60 μm waren in den untersuchten sympathischen Ganglien nicht zu beobachten.

Statistisch wurden die folgenden Nullhypothesen geprüft:

- Die Grundgesamtheiten der Anteile 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiver Gefäße an den RECA-1-positiven Gefäßen unterscheiden sich zwischen den Gefäßkaliberklassen 1-20 μm und 41-60 μm nicht.
- Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der Größe des Gefäßkalibers und dem Anteil 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiver Gefäße.
- Die Grundgesamtheiten der Messparameter Anzahl der RECA-1- und 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiven Gefäße unterscheiden sich über drei Etagen der longitudinalen Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht.

Vergleicht man das jeweilige Verhältnis 5-HT_{2A}-rezeptorpositiver Gefäße zur Anzahl RECA-1-positiver Gefäße für die Kaliberklassen 1-20 μm und 41-60 μm mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests, so ist ein Unterschied in der Grundgesamtheit im Sinne eines höheren Anteils 5-HT_{2A}-rezeptorpositiver Gefäße in der Klasse 41-60 μm mit $p < 0,05$ statistisch signifikant, d. h. mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ lässt sich annehmen, dass der Anteil rezeptorpositiver Gefäße eines Kalibers von 1-20 μm kleiner ist als der Anteil solcher Gefäße eines Kalibers von 41-60 μm (vgl. Abb. 3.38 und 3.39). Man findet des weiteren beim Mittelwerts- und Streuungsvergleich der Messwerte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests keinen signifikanten Unterschied innerhalb der drei Etagen der longitudinalen Ganglienachse sowie mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, d. h. diese beiden Nullhypothesen können nicht verworfen werden (vgl. Abb. 3.38).

Erzeugt man eine (ordinalskalierte) Rangreihe aller Gefäße nach ihrem Gefäßkaliber in sechs Klassen und stellt das Tragen eines 5-HT_{2A}-Rezeptors seitens des Gefäßes als dichotomes Merkmal gegenüber, so kann man mit Hilfe der biserialen Rangkorrelation einen Zusammenhang untersuchen. Es ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $R_s(\text{bis, corr}) = 0,25$, der sich mit Hilfe des U-Tests auf dem Niveau $p < 0,05$ als signifikant erweist (vgl. Abb. 3.39).

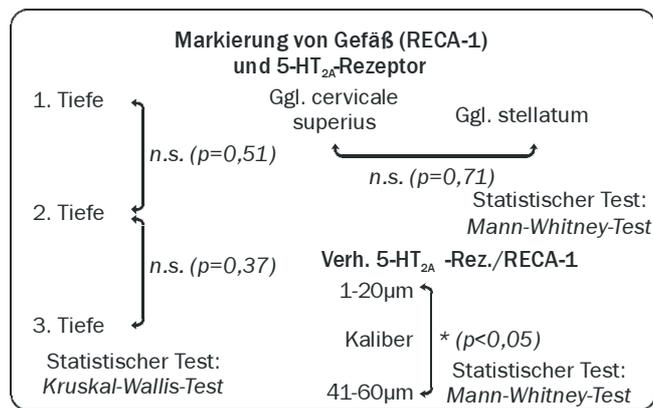


Abb. 3.38: Zu sehen ist das Ergebnis der statistischen Testung bezüglich möglicher Unterschiede der Messparameter über die longitudinale Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum (N=36 Bilder). Bei ersterem kam der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test und bei letzterem der Mann-Whitney-Test zum Vergleich dreier bzw. zweier Grundgesamtheiten zur Anwendung. Ein möglicher Unterschied der Messparameter über die longitudinale Ganglienachse sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum erweist sich jeweils als nicht signifikant (n.s.). Weiterhin stellt sich mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ein signifikant (*) größerer Anteil 5-HT₃-Rezeptor-positiver Gefäße an den RECA-1-positiven Gefäßen in der Kaliberklasse 41-60 µm im Vergleich zur Klasse 1-20 µm dar.

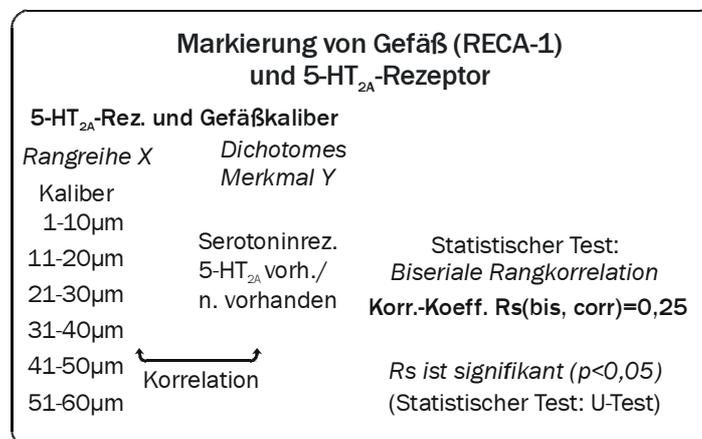


Abb. 3.39: Zu sehen ist das Ergebnis der statistischen Testung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Kaliber eines Gefäßes und dem Tragen eines Serotoninrezeptors vom Typ 2A, was mit dem Verfahren der biserialen Rangkorrelation überprüft wurde (N=36 Bilder). Der mit dem Kaliber steigende Anteil 5-HT_{2A}-positiver Gefäße (vgl. Abb. 3.37, 3.38 und 3.40) findet sich in einem rho-analogen Korrelationskoeffizienten Rs(bis, corr)=0,25 wieder. Er wurde für alle auftretenden Rangbindungen korrigiert und erweist sich mit Hilfe des U-Tests auf dem Niveau p<0,05 als von 0 signifikant unterschiedlich.

Verhältnis der 5-HT_{2A}-positiven
zu den RECA-1-positiven Gefäßen

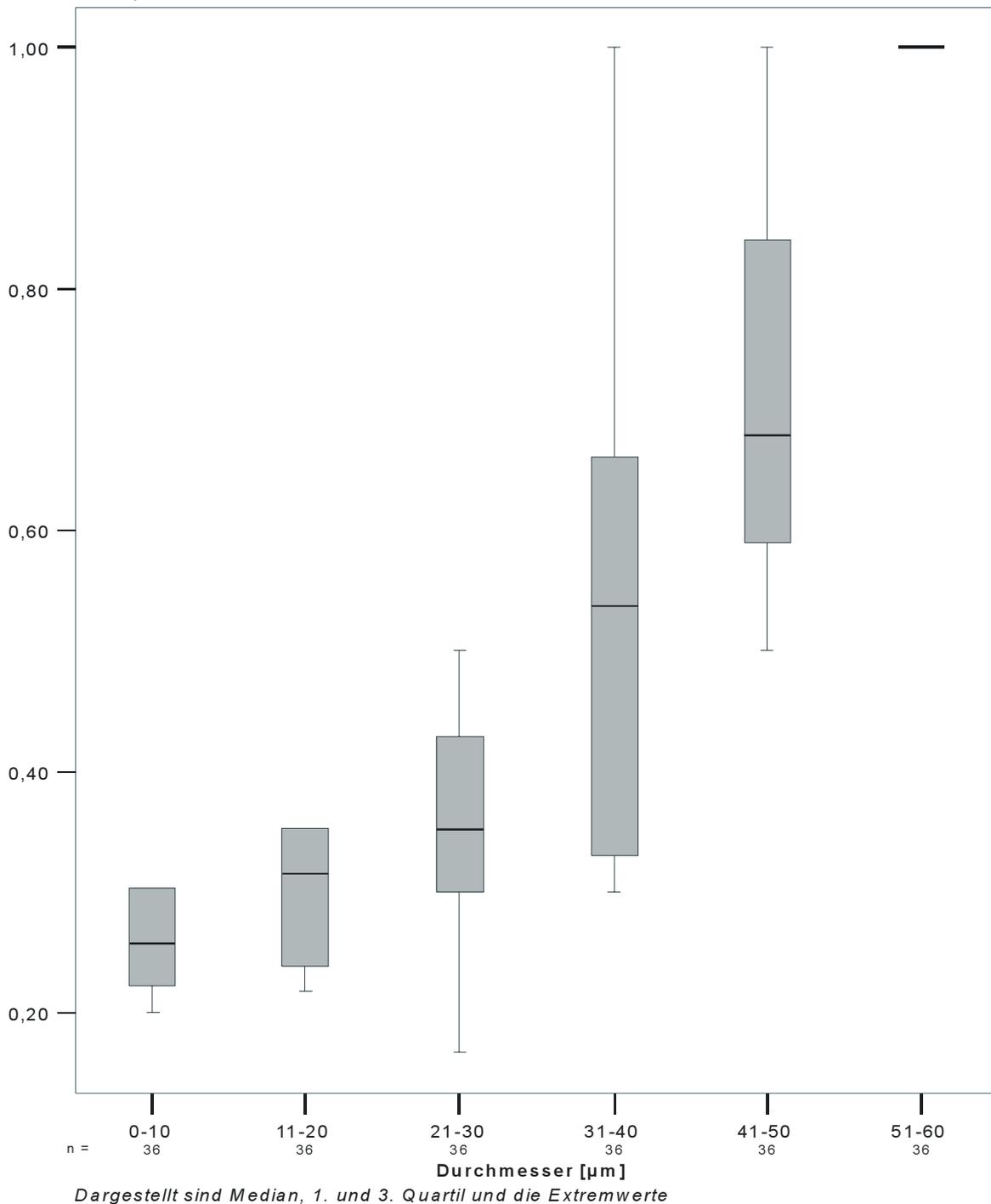


Abb. 3.40: Im Diagramm ist der Anteil 5-HT_{2A}-positiver Gefäße an den RECA-1-positiven Gefäßen nach Gefäßkaliberklassen in Form eines Boxplots dargestellt; hierbei sind Median, erstes und drittes Quartil und die Extremwerte eingezeichnet. Man erkennt den deutlich höheren Anteil 5-HT_{2A}-positiver Gefäße an den RECA-1-positiven Gefäßen der Kaliberklassen 41-60 μm im Vergleich zur Klasse von 11-30 μm .

4. Diskussion

4.1 Darstellung der serotoninhaltigen Mastzelle

Die Mastzellen der Ratte lassen sich leicht durch immunhistochemische Markierung ihres endogenen Serotonins darstellen, da Mastzellen der Rodentia über große Mengen dieses biogenen Amins verfügen [Lethosalo et al. 1984; Skofitsch et al. 1985]. Hierbei zeigen sich ausschließlich rund-ovale, solitäre Zellen mit zytoplasmatischen Granula intensiver Fluoreszenz, die als Mastzellen identifiziert werden können. Pro Ganglion lassen sich 31 ± 22 Mastzellen zählen. In keinem Fall ist an Neuronen, Glia und Gefäßen Serotonin-Immunreaktivität nachweisbar. Skofitsch et al. [1985] beschreiben als kennzeichnendes Merkmal der Mastzelle in der immunhistochemischen Darstellung ihre polyedrische Form und ihre großen Granula. Bei Zugrundelegung dieser morphologischen Kriterien kann man von einer einzigen, immunhistochemisch serotoninpositiven Zellart in den beiden sympathischen Ganglien der Ratte ausgehen. Für die Serotonin-Immunhistochemie ist die hier durchgeführte Formalinfixierung des Gewebes besonders gut geeignet [Schipper und Tilders 1983]. Das sehr gut wasserlösliche Serotonin wird nach Formalinfixierung eher im Gewebe zurückgehalten, was wahrscheinlich auf eine kovalente Bindung des Serotonins an Proteine durch Formalin zurückzuführen ist [Schipper und Tilders 1983].

Die Verteilung der serotoninpositiven Zellen erweist sich topographisch als homogen und übereinstimmend zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum. Es lassen sich in der Längsachse der Ganglien keine bevorzugten Lokalisationen der Mastzellen entdecken. Die statistische Testung, zu deren Zweck die Ganglien in das Zentrum und die beiden Pole gedrittelt wurden, liefert beim Vergleich der Grundgesamtheiten der Mastzellzahlen dieser drei Etagen keine signifikanten Unterschiede. Dem analog erweisen sich die Mastzellzahlen des Ganglion cervicale superius und des Ganglion stellatum statistisch als nicht signifikant unterschiedlich. Man kann somit von einer topographisch homogenen Verteilung der Mastzelle in der longitudinalen Ganglienachse und zwischen den beiden sympathischen Ganglien ausgehen.

Dail und Barton [1983] berichten von einer topographischen Verteilung der Neurone des Ganglion cervicale superius, die sich an deren Projektion orientiert: So befinden sich Neurone im rostralen Teil, die zur Iris und zur Harderschen Drüse projizieren; Neurone, die als Erfolgsorgan die Gll. submandibularis et parotis haben, sind im kaudalen Teil des Ganglions zu finden. Die postganglionären Neurone des Ganglion stellatum orientieren sich topographisch am segmentalen Ursprung ihres präganglionären Neurons [Dail und Barton 1983]. Die Mastzelle jedoch findet sich nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit topographisch homogen in den sympathischen Ganglien verteilt; eine generelle Mastzellaktivierung hätte somit auch eine ungezielte neuronale Beeinflussung zur Folge.

Das Vorhandensein und das Überleben von Mastzellen im Gehirn hängt von intrinsischen Faktoren ab, etwa von chemotaktischen Faktoren und Wachstumsfaktoren, die dort produziert werden [Zhuang et al.

1997]. Entsprechend lassen sich auch für die Mikroumgebung der Mastzelle in sympathischen Ganglien günstige Bedingungen für ihre Reifung und spezifische phänotypische Ausgestaltung sowie ihr dauerhaftes Überleben postulieren. Es hat sich gezeigt, dass Mastzellen, die im Bereich des Neuropils abseits von anderen immunkompetenten Zellen liegen, eine normale ultrastrukturelle Architektur aufweisen [Silver et al. 1996].

4.2 Topographische Beziehung zwischen Mastzelle und Perineurium

Man findet GluT-1-Immunreaktivität in hoher Intensität am Perineurium [Pardridge et al. 1990; Magnani et al. 1996; Takata et al. 1997]; er kann damit als funktioneller Marker dieser Barriere gelten. Auffällig ist die ausgeprägte intra- und extraganglionäre Anhäufung der serotoninhaltigen Mastzelle im Bereich des Perineuriums. Fast ein Viertel aller Mastzellen zeigt sich in der Immunhistochemie unmittelbar im Bereich des Perineuriums, ohne dass sich zwischen beiden Strukturen ein messbarer Abstand darstellt. 37,6%±23,9% aller detektierbaren Mastzellen liegen maximal 20 µm weit von der perineuralen Barriere entfernt. Die statistische Überprüfung ergibt, dass sich im Bereich bis maximal 20 µm Distanz vom Perineurium sowohl intra- als auch extraganglionär signifikant mehr Mastzellen befinden als jeweils auf einer Distanz zwischen 21 und 50 µm. Dagegen lässt sich statistisch zwischen der Anzahl Mastzellen auf einer Distanz zwischen 21 und 50 µm intra- und extraganglionär kein signifikanter Unterschied finden, ebenso nicht zwischen den Mastzellzahlen dieser Distanzklassen des Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum.

Die topographische Beziehung zwischen Mastzelle und Perineurium, einer maßgeblichen Schrankenstruktur der Ganglien, ist somit offensichtlich. Die Frage einer serotonergen Modulation der perineuralen Barriere lässt sich jedoch mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht ausreichend beantworten; man findet im Bereich des Perineuriums weder 5-HT_{2A}- noch 5-HT₃-Rezeptor-immunreaktive Strukturen, die die Mastzelle auf diesem Weg beeinflussen könnte. Offen bleibt ferner die Möglichkeit, dass die Mastzelle mittels anderer, bei der Degranulation liberierter Substanzen wie Histamin oder Derivate der Arachidonsäure, auf das Perineurium wirken könnte. Jedoch können Mastzellen die stark ausgeprägte mikropinozytotische Aktivität der Perineuralzellen modulieren [Dyer 1978]. Möglicherweise wird die Mastzelle in dieser Position durch eine Leckage der Barriere aktiviert. Die Mastzelle gehört zu den empfindlichsten Zelle des Körpers, die auf Veränderungen der Tonizität eines Mediums reagieren [Pepys 1979]. Möglicherweise wird die Homöostase des endoneuralen Kompartiments durch zellmauserungsbedingte, permanent auftretende Mikroläsionen des Perineuriums gestört. Die Mastzelle könnte dann einerseits die Funktion der perineuralen Schranke mittels ihrer Degranulationsprodukte beeinflussen und andererseits chemotaktisch Entzündungszellen dorthin rekrutieren, die durch Reparaturvorgänge wieder eine Abdichtung der Leckage

bewirken können. Allerdings wirft diese statische Vorstellung die Frage auf, wodurch die mobile Mastzelle selbst an die Schrankenstrukturen rekrutiert wird.

4.3 Topographische Beziehung zwischen Mastzelle und postkapillären Venulen

Durch Markierung des Oberflächenantigens RECA-1 lässt sich selektiv und speziesspezifisch das Endothel der Ratte darstellen [Duijvestijn et al. 1992]. Neben dem Perineurium zeigen auch einige Gefäße GluT-1-Immunreaktivität; ob sich der Glucosetransporter in den äußeren Schichten der Gefäßwand, oder in umschließenden, perineuralen Septen befindet, lässt sich immunhistochemisch nicht eindeutig klären. Die RECA-1-positiven Gefäße sind homogen in den sympathischen Ganglien verteilt und den GluT-1-positiven zahlenmäßig überlegen, die in bestimmten Regionen ohne erkennbare Regelmäßigkeit eine geringere Dichte aufweisen. Deutlich ist jedoch die topographische Beziehung der Mastzelle zu den mittels RECA-1-Markierung darstellbaren Gefäßen, die sich in geringerer Ausprägung auch bei den GluT-1-positiven erkennen lässt. Der durchschnittliche Abstand zwischen Mastzelle und RECA-1-positiven Gefäßen beträgt $5 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$, wogegen sich die annähernd parallel verlaufenden Gefäße selbst [Forssmann 1964] $56 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$ voneinander entfernt finden. Der durchschnittliche Abstand der Mastzelle zum nächsten GluT-1-positiven Gefäß beträgt jedoch $30 \mu\text{m}$. Die Mitte der Distanz zwischen zwei solchen RECA-1-positiven Gefäßen wäre der Ort maximal möglicher Entfernung zwischen Mastzelle und einem Gefäß. Unter der Hypothese, es gebe keinen topographischen Bezug zwischen Mastzelle und Gefäß, müsste sie sich durchschnittlich auf der halbmaximalen Entfernung zu einem Gefäß befinden. Tatsächlich liegt die Mastzelle etwa auf einem Viertel der maximalen und der Hälfte der halbmaximalen Entfernung; die Distanz zwischen Mastzelle und Gefäß unterscheidet sich auch statistisch signifikant von dem Abstand der Gefäße untereinander. Bildlich dargestellt, befindet sich die Mastzelle im Durchschnitt um die Hälfte ihres eigenen Durchmessers von einem Gefäß entfernt. Der Durchmesser des der Mastzelle nächstgelegenen Gefäßes beträgt $22 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$; anhand ihres Wandaufbaus lassen sich die meisten dieser Gefäße als postkapilläre Venulen identifizieren.

Somit kann die bekannte Affinität der Mastzelle zu den Gefäßen [Wasserman 1979; Galli 1993; Lydyard und Grossi 1995], die durch Markierung des spezifischen Epitops RECA-1 alle sichtbar waren, auch für die sympathischen Ganglien gelten. Auffallend ist jedoch, dass sich die Mastzelle $5 \mu\text{m}$ vom nächsten RECA-1-positiven Gefäß, jedoch $30 \mu\text{m}$ vom nächsten GluT-1-positivem Gefäß entfernt befindet, was etwa der Hälfte des Abstands der RECA-1-positiven Gefäße entspricht. Offensichtlich gilt die gefundene topographische Beziehung zwischen Mastzelle und Gefäß nicht für die GluT-1-positiven. Jedoch kann die größere Distanz zwischen Mastzelle und GluT-1-positivem Gefäß auch aus der Kombination einer inhomogenen Verteilung GluT-1-positiver Gefäße und deren geringerer Zahl im Vergleich zu den RECA-1-positiven resultieren. Offen bleibt, weshalb in manchen Regionen nahezu alle RECA-1-positiven Gefäße

auch GluT-1-Immunreaktivität zeigen, wogegen deren Verhältnis an anderen Lokalisationen ohne erkennbares System 2:1 bis 3:1 beträgt.

Das prinzipielle Vorkommen des GluT-1 an endoneuralen Kapillaren und am Perineurium [Magnani et al. 1996; Tserentsoodol et al. 1999] ist bekannt, und er gilt als funktioneller Marker dieser Strukturen [Partridge et al. 1990; Magnani et al. 1996; Takata et al. 1997], jedoch finden die Inhomogenitäten keine Erwähnung. Experimente mit kultivierten Endothelzellen endoneuralen Ursprungs zeigen, dass in vitro deren Expression des GluT-1 rapide herunterreguliert wird [Kanda et al. 1997]. Man kann daher das Tragen des GluT-1 als Ausdruck des momentanen Funktionszustandes der Schrankenstrukturen ansehen. Die Wahrscheinlichkeit eines möglichen Eindringens von Fremdsubstanzen ist an der „undichteren“ Gesamtheit der endoneuralen, RECA-1-positiven Gefäße höher als an den „dichteren“, GluT-1-tragenden Gefäßen; die bevorzugt an RECA-1-positiven Gefäßen vorzufindende Mastzelle ist somit an den maßgeblichen Schrankenstrukturen bereits resident [Wasserman 1979]. Im Gegensatz zum Gehirn haben in peripheren Ganglien große Moleküle eher Zugang zum endoneuralen Kompartiment, was mit dem Fehlen bzw. einer geringeren Wirksamkeit der Blut-Ganglien-Schranke im peripheren Nervensystem zusammenhängt [Dail und Barton 1983; Ten Tusscher et al. 1989]. Elektrophysiologische Experimente zeigen ebenfalls, dass das periphere Nervensystem von sehr viel leichter penetrierbaren Diffusionsbarrieren umgeben ist als das zentrale [Weerasuriya 1987]. Wie bereits zuvor beschrieben, könnte die Mastzelle durch permanente „Mikroleckagen“ der Nicht-GluT-1-tragenden Gefäße dorthin rekrutiert werden, womit sich auch ihre offensichtliche Position erklären ließe. Für die Neurone haben die Satellitenzellen in autonomen Ganglien in Bezug auf große Moleküle eine effektive Barrierefunktion [Ten Tusscher et al. 1989]. Viele Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke erweisen sich als astrozytenabhängig; bei der Steuerung der Blut-Nerven-Schranke sind induktive Einflüsse der Schwannschen Zellen wahrscheinlich [Orte et al. 1999]. Möglicherweise kann die Mastzelle auch serotonerg die Funktion der 5-HT₃-Rezeptor-tragenden Satellitenzellen beeinflussen und somit eine weitere, die Neurone direkt umgebende Barriere steuern.

4.4 5-HT_{2A}-Rezeptor an postkapillären Venulen

5-HT_{2A}-Rezeptoren finden sich an einem Teil der RECA-1-positiven Gefäße, der mit zunehmendem Kaliber deutlich steigt. So zeigen in der Kaliberklasse bis 10 µm 23,5% der Gefäße 5-HT_{2A}-Rezeptor-Immunreaktivität; in der Klasse zwischen 41 µm und 50 µm Durchmesser sind es 45,5%. Bei der statistischen Überprüfung zeigt der nichtparametrische Mann-Whitney-Test eine signifikant höhere Anzahl 5-HT_{2A}-Rezeptor-positiver Gefäße der Kaliberklasse 41 µm-60 µm als in der Klasse 1 µm-20 µm. Das Verfahren der biserialen Rangkorrelation [Bortz und Lienert 1998] zwischen dem ordinalskalierten Merkmal von sechs Kaliberklassen mit jeweils 10 µm Breite und der dichotomen Eigenschaft des Rezeptorbesatzes liefert einen rho-analogen Korrelationskoeffizienten von 0,25, der sich mit Hilfe des U-Tests als von 0

signifikant unterschiedlich erweist. Die beschriebenen Verhältnisse unterscheiden sich überdies sowohl zwischen Ganglienzentrum und den beiden Polen sowie zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum nicht signifikant. Somit kann die Zunahme des Anteils 5-HT_{2A}-Rezeptor-tragender Gefäße mit deren Kaliber als statistisch gesichert gelten. Unter Einbeziehung der Wandstruktur dieser bevorzugt 5-HT_{2A}-Rezeptor tragenden Gefäße erkennt man, dass es sich vornehmlich um postkapilläre Venulen handelt.

Bei zahlreichen Blutgefäßen von Ratte und Schwein lässt sich die mRNA (messenger-Ribonucleinsäure) der Serotoninrezeptoren 5-HT_{1Dβ}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ und 5-HT₇ in verschiedener Menge finden; in den glatten Muskelzellen aus humaner Aorta und A. pulmonalis lässt sich die mRNA der Serotoninrezeptoren 5-HT_{1Dβ}, 5-HT_{2A}, teilweise 5-HT_{2B}, und 5-HT₇ detektieren [Ullmer et al. 1995].

Glatte Muskelzellen der Rattenaorta zeigen in Kultur eine Überexpression der mRNA des 5-HT₂-Rezeptortyps, der eine Kontraktion vermittelt [Corson et al. 1992]. Der 5-HT_{2A}-Rezeptor soll die vaso-konstriktorische Komponente der Reaktion von Blutgefäßen auf Serotonin vermitteln [Piera et al. 1995]. Die serotonininduzierte Vasokonstriktion von Koronararterien des Kaninchens wird über 5-HT_{1B/D}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt [Ellwood und Curtis 1997]; eine vergleichbare Wirkung des Serotonins via 5-HT_{1B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren wurde für die Pulmonalarterien der Ratte gezeigt [MacLean et al. 1996]. Beim peripheren Nerven kann die Mastzelle via Serotonin auf die 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schwannschen Zellen und des Gefäßbettes wirken [Yoder et al. 1997]. Ebenso ist das prinzipielle Vorkommen von mRNA des 5-HT_{2A}-Rezeptors im Ganglion cervicale superius der Ratte bekannt [Pierce et al. 1996].

Es sind somit im Ganglion cervicale superius die Möglichkeiten serotonerger Gefäßsteuerung seitens der Mastzelle gegeben. Auffallend ist, dass bevorzugt postkapilläre Venulen in den beiden sympathischen Ganglien diesen Serotoninrezeptor tragen. Analog zeigt sich die Mastzelle vornehmlich an diesem Gefäßtypus, so dass eine funktionell-topographische Beziehung naheliegt.

4.5 5-HT₃-Rezeptor an Neuronen und Satellitenzellen, nicht jedoch an cholinergen Synapsen

Der 5-HT₃-Rezeptor lässt sich immunhistochemisch an Perikaryen, im Neuropil und an Satellitenzellen detektieren, jedoch nicht an cholinergen Synapsen. Nebenbefundlich lassen sich letztere nach optischen und vermessungstechnischen Kriterien durch Markierung des VAcHT und von Synaptophysin qualitativ gleichwertig darstellen. Analoge Verhältnisse der beschriebenen Kollokationen lassen sich im Ganglienzentrum und an den Polen vorfinden sowie übereinstimmend bei Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum.

Durch Markierung des VAcHT lassen sich spezifisch kleine synaptische Vesikel cholinergischer Neurone im zentralen und peripheren Nervensystem darstellen; die Markierung funktioniert in sympathischen und parasympathischen Ganglien [Weihe et al. 1996; Arvidsson et al. 1997]. Das Vorkommen des VAcHT erstreckt sich prinzipiell auf das gesamte cholinerge Neuron; der Transporter ist jedoch bevorzugt an den Präsynapsen zu finden [Moller et al. 1997]. Ebenso betrachtet man Synaptophysin als Marker der Präsynapse [Wiedenmann und Franke 1985; Kawai und Senba 2000]. Die immunhistochemische Markierung von Synaptophysin zeigt in der Arbeit von Wiedenmann und Franke [1985] zahlreiche, wenige Mikrometer große, positive Areale, die hauptsächlich an der Circumferenz der Perikaryen sowie im Neuropil zu finden sind und somit als Präsynapsen interpretiert werden können. Die eigenen Befunde der Präsynapsenmarkierung sind mit den genannten konform. In der immunhistochemischen Doppelmarkierung des 5-HT₃-Rezeptors mit VAcHT bzw. Synaptophysin nimmt die Überschneidungsfläche der präsynaptischen Endigungen mit den 5-HT₃-Rezeptoren 4,4%±2,0% bzw. 5,6%±4,1% der Präsynapsenfläche und 0,5%±0,3% bzw. 0,5%±0,3% der 5-HT₃-Rezeptorenfläche ein. Die Präsynapsenfläche unterscheidet sich dem analog statistisch signifikant ($p < 0,01$) von der Überschneidungsfläche der Präsynapsen mit den 5-HT₃-Rezeptoren, so dass eine Kolokalisation beider zumindest als äußerst selten betrachtet werden kann. Man kann die vermeintlichen Kolokalisationen aufgrund ihrer minimalen Größe als Überschneidungs- oder Überblendungsartefakte diskutieren. Als Rarität zeigen mancherorts etwa 10 bis 20 µm große Zellen mit wenigen Ausläufern Immunreaktivität gegen Synaptophysin, die im gesamten Zytoplasmabereich zu sehen ist; diese Zellen sind die SIF-Zellen, die verschiedene Vesikelmembranproteine wie Synaptophysin, Synaptotagmin I und Synaptobrevin II enthalten [Wiedenmann und Franke 1985; Hou und Dahlström 1996].

Man erkennt in der Darstellung der Neurone bzw. Satellitenzellen zusammen mit dem 5-HT₃-Rezeptor, dass die Perikaryen von einerseits fadenförmigen, andererseits wenige Mikrometer messenden ovalen, 5-HT₃-Rezeptor-immunreaktiven Strukturen, die auch im Neuropil zu finden sind, umsäumt werden. Man kann die fadenförmigen Strukturen, die immunhistochemisch Kongruenz sowohl mit PGP 9.5- als auch Vimentin-immunreaktiven Elementen zeigen, nicht eindeutig als neuronale Membran oder als Ausläufer der spindelförmigen Satellitenzelle identifizieren. Die ovalen, 5-HT₃-Rezeptor-positiven Elemente sind dagegen den Satellitenzellen zuzurechnen. Etwa mit gleicher Häufigkeit zeigen sich am Perikaryenumfang immunhistochemisch Satellitenzellen, die keinen 5-HT₃-Rezeptor tragen, sich aber von den 5-HT₃-Rezeptor-positiven sonst nicht weiter unterscheiden. Der Anteil der 5-HT₃-Rezeptor-positiven Fläche ist im Bereich des PGP 9.5-positiven Neuropils etwa doppelt so hoch wie an den PGP 9.5-positiven Perikaryen: Dies erklärt sich durch die Assoziation des 5-HT₃-Rezeptors mit der neuronalen Membran, da im Schnitt des Neuropils wesentlich mehr Membranfläche getroffen wird als beim Perikaryon. Allerdings findet sich bei einem Teil der Neurone auch 5-HT₃-Rezeptor-Immunreaktivität deutlich geringerer Intensität im zellmembranfernen Bereich des Perikaryons. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das intra-

zelluläre Rezeptorprotein, welches in Richtung der Zellmembran transportiert wird. Weiterhin findet man die Untereinheit A dieses Serotoninrezeptors bei Neuronen des Vorderhirns, des Hirnstamms sowie des Rückenmarks der Ratte auf subzellulärer Ebene auch in der Kernmembran und im endoplasmatischen Retikulum sowie an der Plasmamembran der Dendriten [Morales et al. 1996b; Morales et al. 1998].

Bei der Interpretation der Doppelimmunfluoreszenzen zur Frage der Kollokalisierung zweier, beispielsweise mit FITC- und Cy-3-markierter Epitope, müssen mögliche Überschneidungsartefakte berücksichtigt werden (s. Abb. 4.1). Bei einer relativ großen Schnittdicke von 12 µm kann es durch Übereinanderprojektion räumlich entfernter Strukturen, die unterschiedliche Epitope tragen, bedingt durch die Reduktion auf ein zweidimensionales Bild, zur scheinbaren Kollokalisierung kommen.

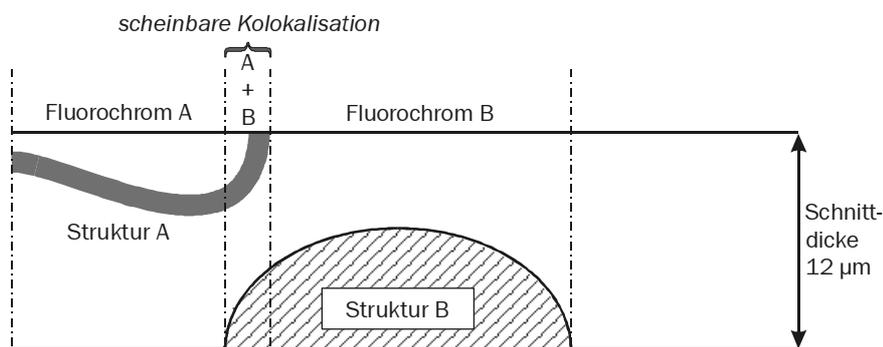


Abb. 4.1: Dargestellt ist ein Gewebeschnitt von 12 µm Dicke, der zwei verschiedene, mittels der Fluorochrome A und B markierte Epitope enthält. Zur Frage einer Kollokalisierung der beiden Epitope wird eine Doppelbelichtung des Schnittes angefertigt. Unter der Annahme, Epitop A sei ausschließlich in Struktur A und Epitop B ausschließlich in B zu finden, entsteht möglicherweise der Eindruck einer nichtvorhandenen Kollokalisierung. Dies ist bedingt durch die räumliche Lage der beiden Strukturen in Verbindung mit einer relativ großen Schnittdicke von 12 µm, wodurch es im zweidimensionalen Mikroskopbild zur Überlagerung kommt.

Dieses Problem des dicken Schnittes ist dem sog. Holmes-Effekt, d.h. der scheinbaren Flächenreduktion zweier Körper durch sterische Überlagerung im zweidimensionalen Bild [Fetzer 1978], vergleichbar.

Die gesehene Kollokalisierung des 5-HT₃-Rezeptors mit cholinergen Präsynapsen ist folglich mit großer Wahrscheinlichkeit artefaktbedingt. Aufgrund des eindeutigen, statistisch gesicherten Ergebnisses der Messungen steht die Aussage, dass keine Kollokalisierungen zwischen den 5-HT₃-Rezeptoren und Präsynapsen zu verzeichnen sind.

Dagegen finden sich die Kollokalisierung des 5-HT₃-Rezeptors mit den Satellitenzellen einerseits in großer Zahl und andererseits oftmals im Bereich des Kern der Satellitenzellen. Die Satellitenzellen von autonomen Ganglien sind an ihren Zellgrenzen miteinander verzahnt und durch tight junctions verbunden; sie stellen möglicherweise generell für große Moleküle eine effektive Barriere dar [Ten Tusscher et al. 1989].

Aufgrund dieser Funktion der Satellitenzellen und ihres 5-HT₃-Rezeptorbesatzes liegt eine mastzellvermittelte Steuerung via Serotonin nahe. Es bestehen einige morphologische Gemeinsamkeiten zwischen Neuron und Satellitenzelle, wie paraphytäre Ausstülpungen der Zellmembran in die Nachbarzelle, woraus sich eine enge funktionelle Gemeinschaft ableitet [Pannese 1960; Forssmann 1964]. Gleichermaßen lassen sich an beiden Zellen 5-HT₃-Rezeptoren detektieren. Die Frage, ob sowohl die neuronale Membran als auch die Zellmembran der Satellitenzelle den 5-HT₃-Rezeptor tragen, kann aus der immunhistochemischen Untersuchung heraus zwar mit großer Wahrscheinlichkeit positiv beantwortet werden, verlangt jedoch zur dezidierten Klärung weiterführende ultrastrukturelle Untersuchungen.

Es lassen sich jedoch hierzu zahlreiche, methodologisch unterschiedliche Arbeiten zur Expression dieses Rezeptorsubtyps in den sympathischen Ganglien anführen. Pharmakologisch kann man drei verschiedene Serotoninrezeptoren im Ganglion cervicale superius des Meerschweinchens identifizieren: Geringe Konzentrationen von Serotonin aktivieren 5-HT_{2A}-Rezeptoren und höhere Konzentrationen ebenso 5-HT₃-Rezeptoren sowie einen den 5-HT₂-Rezeptoren homologen, möglicherweise aber neuen, unklassifizierten Serotoninrezeptor [Watkins und Newberry 1996]. Im Ganglion cervicale superius der Ratte lässt sich die mRNA folgender Serotoninrezeptortypen nachweisen: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₆ und 5-HT₇; die lumbalen sympathischen Ganglien zeigen bis auf das Fehlen des 5-HT₆-Rezeptors die gleiche Ausstattung mit Serotoninrezeptoren wie das Ganglion cervicale superius [Pierce et al. 1996].

Die Expression des 5-HT₃-Rezeptors an Neuronen des Ganglion cervicale superius hängt vom Entwicklungsstadium ab: Bis zum 21. Tag der Embryonalentwicklung steigt unabhängig von präganglionärer Innervation, durch Neurotrophine reguliert, die Zahl der 5-HT₃-Rezeptoren der sympathischen Neurone stetig an [Rosenberg et al. 1997].

Das prinzipielle Vorkommen der 5-HT_{2A}- und 5-HT₃-Rezeptoren ist also in verschiedenen Untersuchungen bereits belegt; einen wesentlichen Beitrag zur zellulären Lokalisation in den sympathischen Ganglien in situ leistet diese Arbeit.

4.6 Aktivierung der Mastzelle in sympathischen Ganglien

4.6.1 Immunologische Aktivierung

Eine immunologische Aktivierbarkeit von residenten Mastzellen in den sympathischen Ganglien ist stets gegeben. IgE erreicht als humoraler Steuerungsfaktor seine Zielzellen wahrscheinlich recht leicht aufgrund der Durchlässigkeit der Blut-Ganglien-Schranke [Dail und Barton 1983; Ten Tusscher et al. 1989] bzw. generell der Barrieren des peripheren Nervensystems [Weerasuriya 1987]. Kommt eine mit IgE-Antikörpern beladene Mastzelle mit dem homologen Antigen in Berührung, dann erfolgt eine Brückenbindung der Antikörper durch das Antigen, und die Mastzelle degranuliert und setzt Substanzen wie His-

tamin, Serotonin, Heparin, PAF, Prostaglandine und weitere Zytokine frei. Durch Il-4 und Il-5 wird die spezifische B ϵ -Zelle im Sinne einer positiven Rückkopplung zur weiteren IgE-Produktion veranlasst (s. Abschnitt 1.4). Lokale vasoaktive Faktoren der Mastzelle bewirken eine Permeabilitätssteigerung der Gefäße, wodurch das auslösende Antigen auch zu tiefergelegenen Mastzellen vordringen kann [Wasserman 1979]. Die bei der Degranulation liberierten chemotaktischen Faktoren lösen weiterhin eine lokale zelluläre Antwort aus [Wasserman 1979]. Zytokine wie TNF- α und neutrale Proteasen sowie biogene Amine und Lipidmediatoren der Mastzelle rekrutieren Leukozyten an den betreffenden Ort [Wasserman 1979; Wedemeyer et al. 2000]. Es folgt daher meist die sog. Spätphasereaktion, die nach einer Latenz von 4-8 Stunden mit Gewebeswellung und Leukozyteninfiltration einhergeht, an der Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen teilnehmen [Wedemeyer et al. 2000].

4.6.2 Neuropeptiderge Aktivierung

4.6.2.1 Funktionelle Beziehung der Mastzelle zum Nervensystem

Mastzellen zeigen oft strukturelle Beziehungen mit einer Vielzahl anderer Zellen; eine sehr ausgeprägte Annäherung an Nervenendigungen lässt sich in Geweben mit besonders aktiven Mastzellen verzeichnen [Dines und Powell 1997]. So finden sich fast zwei Drittel der Mastzellen im Gastrointestinaltrakt in enger topographischer Beziehung zu Nerven [Stead 1992], und Bindegewebsmastzellen sind im Zwerchfell und den Mesenterien der Ratte häufig mit SP-haltigen Fasern assoziiert [Skofitsch et al. 1985]. Funktionelle Interaktionen zwischen Mastzellen und peripheren Nerven können in vivo an deren zugewandten Seiten auftreten [Bienenstock et al. 1989; Blennerhassett et al. 1991]. Die Mastzellen des Gehirns liegen zum überwiegenden Teil perivaskulär und nahe an den Neuronen, so dass sie über direkte Nervenstimulation oder durch Neuropeptide aktiviert werden können [Theoharides et al. 1993]. Außerdem ist eine enge topographische Beziehung der Hirnmastzellen zu Neuronen bekannt, die über NGF reguliert werden könnte [Theoharides 1990]. NGF wird allgemein eine Beteiligung an der Mastzellaktivierung zugeschrieben [Kawamoto et al. 2002]. Im Hyperalgesiemodell nach Nervenschädigung kann NGF die Degranulation von Mastzellen induzieren, wobei Serotonin frei wird, das die Nozizeptoren sensibilisiert [Theodosiou et al. 1999]. An den sensiblen, unmyelinisierten Nervenendigungen von Fasern der Klassen III und IV, die den Kapselapparat des Kniegelenks innervieren, wurden in großer Zahl Mastzellen gefunden, so dass auch hier ein funktioneller Zusammenhang zwischen den Mastzellen und den Neuronen naheliegt [Hepplmann et al. 1995].

Die formalininduzierte periphere Nozizeption lässt sich an der Rattenpfote durch selektiven Antagonismus an H₁- und H₂-Histaminrezeptoren sowie an 5-HT_{1A}-, 5-HT₃- und 5-HT₄-Serotoninrezeptoren blockieren [Parada et al. 2001]. Am Ort der Reizung residente Mastzellen können somit gleich über zwei biogene Amine und deren Rezeptoren auf periphere sensible Nerven wirken.

Die Assoziation von Mastzellen mit Nerven kann auch als eine ungewöhnliche Form eines Rezeptors für bestimmte Antigene im jeweiligen Parenchym dienen [Bienenstock et al. 1989]. Diese Funktion kann beispielsweise in der bronchialen und gastrointestinalen Mukosa von Nutzen sein [Bienenstock et al. 1989].

4.6.2.2 Neurogene Entzündung

Sensible Nerven vermitteln die Entzündungsreaktion auf irritative Substanzen in Geweben wie der Cornea, der Haut und den Gelenken, worauf durch die Freisetzung von Neuropeptiden wie SP eine neurogene Entzündung des betreffenden Gebietes in Gang gesetzt wird [Lembeck und Holzer 1979; Foreman und Jordan 1984]. SP ist ein im peripheren und zentralen Nervensystem heterogen verteiltes Undekapeptid, das u.a. in peripheren sensiblen Neuronen als Transmitter dient [Black 1993]. Als kennzeichnend für die neurogene Entzündung gelten eine Mastzelldegranulation, eine Vasodilatation mit Extravasation von Plasmaproteinen sowie eine serotonininduzierte Plättchenaggregation (s. Abb. 4.2) [Buzzi et al. 1992; Buzzi und Moskowitz 1992; Schmelz und Petersen 2001; Williamson und Hargreaves 2001]. Baluk [1997] definiert die neurogene Entzündung, die in der Haut und den Atemwegen vorkommt, als eine durch Aktivität von peripheren sensiblen Nerven induzierte Plasmaleckage. Die Mechanismen idiopathischer Kopfschmerzen, wie beispielsweise der Migräne, sind weitgehend unverstanden; eine Aktivierung von trigeminalen sensiblen Fasern führt dabei wahrscheinlich zu einer schmerzhaften neurogenen Entzündung von Duragefäßen, die ebenfalls durch Neuropeptide der sensiblen Fasern vermittelt wird [Buzzi et al. 1992; Buzzi und Moskowitz 1992; Williamson und Hargreaves 2001]. Der in Vorgänge der neurogenen Entzündung vornehmlich einbezogene Gefäßtypus, der auch strukturelle Veränderungen wie Vakuolisierung und Zunahme der Vesikel im Endothel aufweist, ist die postkapilläre Venule [Buzzi et al. 1992; Buzzi und Moskowitz 1992]. Wahrscheinlich wird die Vasodilatation von SP und CGRP induziert [Rozniecki et al. 1996; Baluk 1997; Liang et al. 2000; Williamson und Hargreaves 2001]; sie lässt sich durch Aktivierung von 5-HT_{1B/D}-Rezeptoren des trigemino-vaskulären Systems antagonisieren [Buzzi et al. 1992; Williamson und Hargreaves 2001]. SP vermittelt die neurogene Vasodilatation und Plasmaextravasation sowohl durch direkten Einfluss auf die Blutgefäße als auch durch Induktion der Histaminausschüttung von Mastzellen [Gamse et al. 1980]. SP triggert die Mastzelldegranulation und Freisetzung von Histamin, Serotonin und Entzündungsmediatoren [Johnson und Erdös 1973; Fewtrell et al. 1982; Matsuda et al. 1989; Ohkubo et al. 1994; Naukkarinen et al. 1996]. Wahrscheinlich wird durch Aktivierung von 5-HT_{1B/D}-Rezeptoren, die auf Neuronen vorkommen, die Neuropeptidfreisetzung inhibiert [Buzzi et al. 1992; Buzzi und Moskowitz 1992; Göthert und Starke 2001], was unter Einbeziehung der serotonergen Mastzelle eine Rückkopplung bedeutet. Wie in der Haut tragen auch von trigeminalen Nerven aktivierte Mastzellen zur Vasodilatation und Extravasation von Plasmaproteinen bei [Baluk 1997; Williamson und Hargreaves 2001]. Während SP primär die Plasmaleckage durch reversible Lockerung

des Endothelzellverbandes und Vasodilatation bewirkt [Matsuda 1989; Baluk 1997], sorgt CGRP auch für die Rekrutierung bzw. Steuerung von inflammatorischen Zellen wie Eosinophilen und Mastzellen [Liang et al. 2000]. SP induziert auch die Synthese von Leukotrienen, die ein Ödem verursachen [Le Filiatre et al. 2001]

Die Aktivierung von Mastzellen via SP, die an peripheren SP-haltigen Nervenfasern liegen [Kruger et al. 1985; Skofitsch et al. 1985], verläuft über den NK₁ (Neurokinin-1)-Rezeptor auf der Mastzellmembran [Mori et al. 2002]. Es wird jedoch auch berichtet, daß SP analog zum Sekretagogon Substanz 48/80 die Freisetzung von Ca²⁺ aus internen Speichern induziert, wodurch eine Degranulation initiiert wird [Matthews et al. 1989]. Somit besteht eine funktionelle Kooperation zwischen peripherem sensiblem Nerv und Mastzelle [Heppelmann et al. 1995]. Die simultane Applikation von SP und CGRP auf die Mastzelle löst eine sehr starke Degranulation aus, die sich überadditiv-synergistisch bezüglich des degranulationsinduzierenden Potenzials eines jeden einzelnen Neuropeptids verhält [Reynier-Rebuffel et al. 1994]. Interessanterweise kann die Mastzell-Tryptase aber CGRP degradieren, so dass neurogene Stimuli einer Mastzelldegranulation vornehmlich via SP übertragen werden [Naukkarinen et al. 1996]. Bindegewebsmastzellen reagieren überdies empfindlicher auf SP als Mukosamastzellen [Rozniecki et al. 1999].

Bei der neurogenen Entzündung in der Haut von Nagetieren führt die Aktivierung von Nozizeptoren zu einer Kombination von Vasodilatation und Extravasation von Plasmaprotein [Schmelz und Petersen 2001]. Die Vasodilatation und Extravasation lassen sich durch Blockade von H₁-Rezeptoren verhindern und eine Neuropeptid-induzierte Entzündungsreaktion kommt bei mastzell-defizienten Tieren nicht zur Ausbildung [Schmelz und Petersen 2001]. Es wurde gezeigt, dass es auch während der neurogenen Entzündung in der Haut zur Freisetzung von Histamin und weiteren Mediatoren aus Mastzellen kommt [Kiernan 1975; Lembeck und Holzer 1979]. Die Rötung der Haut durch intradermal injizierte SP kommt via Mastzellen und deren Histaminliberation zustande [Schmelz und Petersen 2001]. Neuropeptide aus antidrom stimulierten sensiblen Nervenendigungen bewirken gleichermaßen eine Immunmodulation ihres Zielgebietes und können die Degranulation residenter Mastzellen induzieren [Kiernan 1975; Bani-Sacchi et al. 1986; Kowalski und Kaliner 1988; Schmelz und Petersen 2001]. Eine antidrome elektrische Stimulation des N. ischiadicus bewirkt eine deutliche Erhöhung der Histaminausschüttung aus Mastzellen in der Hinterpfote der Ratte [Ohkubo et al 1994].

Im Larynx und im subglottischen Raum wurden beim Menschen in großer Zahl Mastzellen und zugleich SP- und CGRP-haltige Nervenfasern gefunden [Domeij et al. 1996]. Die höchste Dichte solcher Nervenfasern und von Mastzellen wurde gerade in denjenigen Regionen gefunden, in denen sich klinisch am häufigsten Ödeme entwickeln [Domeij et al. 1996], was eine Einbindung der Mastzelle in dortige Mechanismen der neurogenen Entzündung mit Permeabilitätsänderung der Gefäße indiziert.

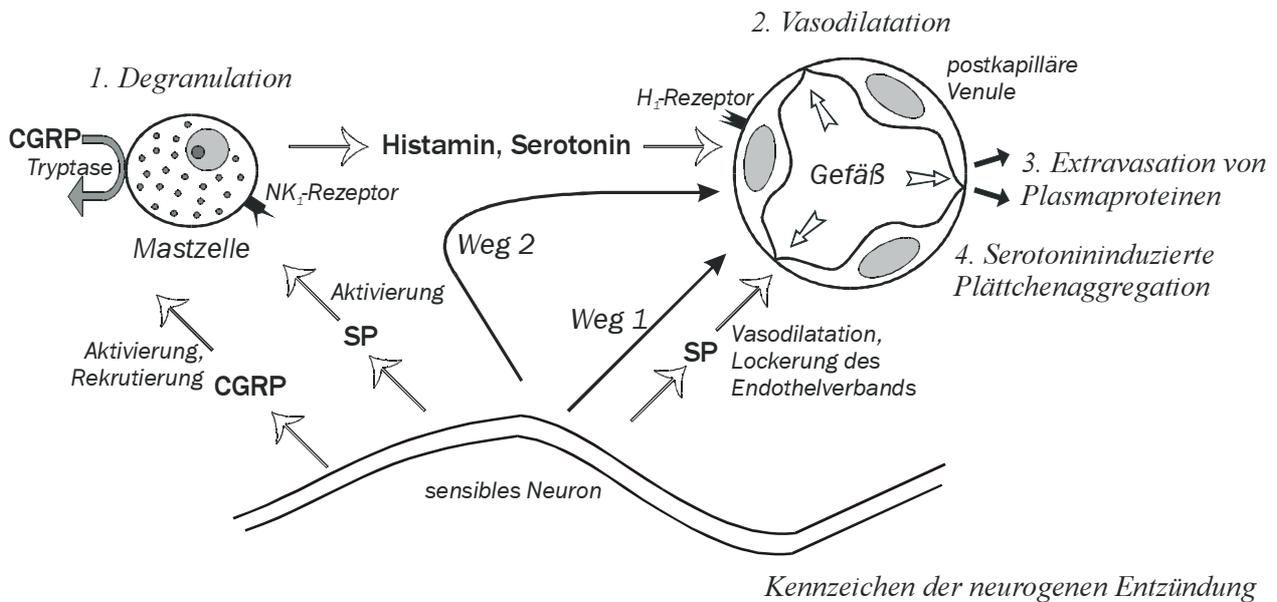


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der wichtigsten Vorgänge der neurogenen Entzündung (Literatur siehe obigen Text). Neuronal stimuliert, kommt es zur entzündlichen Reaktion insbesondere postkapillärer Venulen. Hierbei spielen Neuropeptide wie SP und CGRP eine entscheidende Rolle, die via Stimulation von Mastzellen (Weg 2), die degranulieren und Histamin und Serotonin sowie Entzündungsmediatoren liberieren, und bisweilen auch direkt wirken (Weg 1).

4.6.2.3 SP und CGRP in sympathischen Ganglien und viszeromotorischen Neuronen

In den lumbalen sympathischen Ganglien lassen sich SP-immunreaktive Fasern, die sich mit ihren Varicositäten um die ganglionären Neurone winden, sowie CGRP-immunreaktive Nervenfasern detektieren (s. jeweils Abb. 4.3) [Webber et al. 1987]. SP wird im Ganglion cervicale superius in präganglionären Neuronen und in Kollateralen von unmyelinisierten sensiblen Fasern gefunden [Gibbins et al. 2000], die vermutlich aus dem IX. Hirnnerv stammen [Dail und Barton 1983] und somit zu primär afferenten Neuronen gehören [Höckfelt et al. 1977]; SP ist in ihnen oft mit CGRP kolokalisiert [Gibbins et al. 1985]. CGRP wurde auch in den postganglionären Neuronen der cervicalen und thorakalen sympathischen Ganglien der Katze gefunden [Kummer und Heym 1988]. Die Axone des Ganglion cervicale superius besitzen enge Kontakte mit Pseudopodien oder den Somata von Mastzellen; eine experimentelle Reizung bewirkt eine SP-vermittelte Degranulation von Mastzellen [Ohshiro et al. 2000]. In Zellkultur bilden sympathische Neurone aus dem Ganglion cervicale superius selektiv Kontakte zu Mukosa-Mastzellen aus und halten diese aufrecht; in vivo könnte hierdurch eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem Nerven- und Immunsystem entstehen [Blennerhassett et al. 1991]. Vesikel mit peptidergen Neurotransmittern wie SP finden sich gehäuft im Zytoplasma auf der der Mastzelle zugewandten Seite des sympathischen Neurons in der Zellkultur [Blennerhassett et al. 1991]. Überdies haben Peptide wie SP in sympathischen Ganglien relativ weite Strecken zu überbrücken, bevor sie auf einen neuronalen Neurokinin-Rezeptor

treffen [Gibbins et al. 2000]; diese Distanzen können durch Mastzellen als mobile Zwischenglieder überbrückt werden, die dabei eine Modulation wie Verstärkung, Schwächung sowie räumliche Summation der durch SP vermittelten Information vornehmen können. SP bewirkt wahrscheinlich eine Steigerung der synaptischen Übertragung, wodurch ein ankommender, unter-schwelliger Reiz durch Senkung der Reizschwelle überschwellig, d.h. erregend wirken kann [Dun et al. 1986].

Die Endigungen präganglionärer, SP-haltiger Neurone sind ausschließlich verschaltet mit vasodilatatorischen Neuronen; Endigungen präganglionärer, CGRP-haltiger Neurone sind ausschließlich mit vaso-konstriktorischen Neuronen assoziiert [Gibbins 1992]. Präganglionäre Neurone zeigen somit eine funktions- und verschaltungsspezifische Ausstattung mit bestimmten Neuropeptiden. Eine SP-aktivierte Mastzelle könnte somit auch diskrete Neuronengruppen beeinflussen, wodurch sie letztlich spezifisch auf das Zielgebiet dieser Neurone wirken kann.

Eine Aktivierung von serotoninhaltigen Mastzellen durch neuronal sezernierte SP und CGRP wurde auch für die Gl. lacrimalis [Williams et al. 1996] sowie für die Mukosa des Magens beschrieben [Rydning et al. 1999]. Bei der Gl. lacrimalis steuert die parakrine Mastzelle SP- und CGRP-getriggert serotonerg die Sekretionsleistung der Drüse [Williams et al. 1996]. Nervenfasern des Darmnervensystems, die SP oder CGRP enthalten, zeigen eine enge strukturelle Beziehung zu den dortigen Mastzellen [Stead et al. 1987; Bienenstock et al. 1989]; Mukosamastzellen wurden in synapsenartiger Verbindung mit dem enterischen Nervensystem gefunden [Newson et al. 1983; Stead et al. 1987]. Interessanterweise wird die Mastzelle des Magens - im Gegensatz zu den Untersuchungen von Reynier-Rebuffel et al. [1994] - durch die beiden Neuropeptide antagonistisch gesteuert [Rydning et al. 1999].

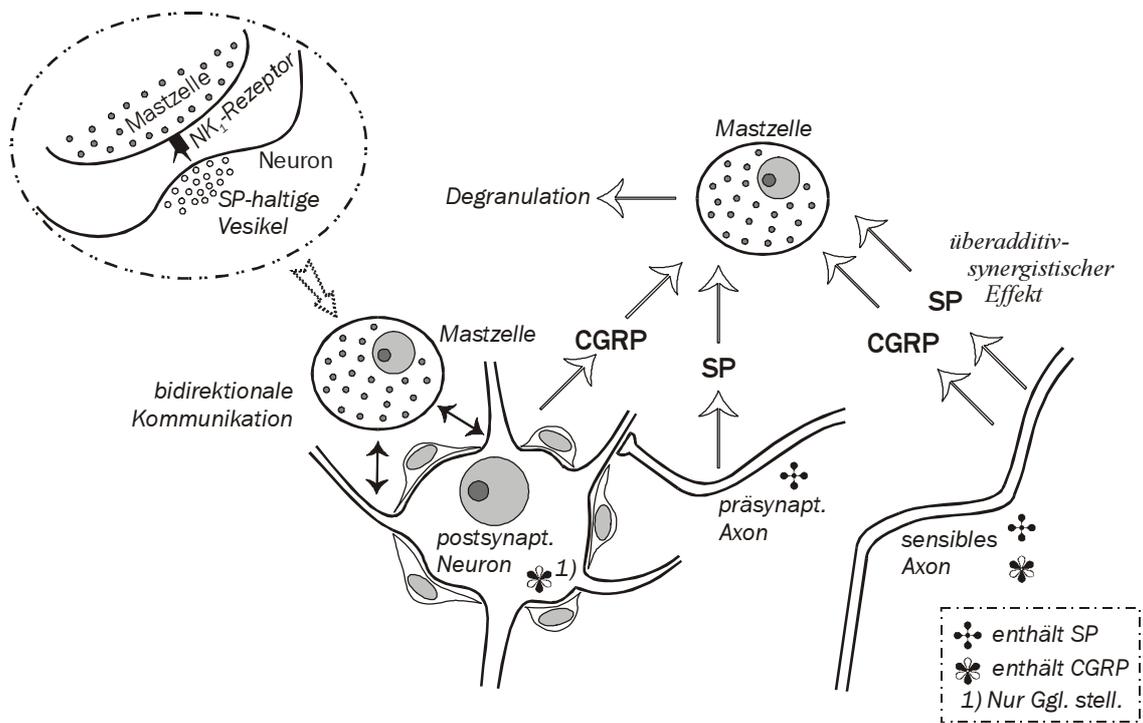


Abb. 4.3: Übersicht über das funktionelle Vorkommen von SP und CGRP in sympathischen Ganglien. Von sensiblen und präsynaptischen Axonen sowie postsynaptischen Neuronen liberiert, bewirken die beiden Neuropeptide mit überadditiv-synergistischem Effekt die Aktivierung residenter Mastzellen, wozu auch die enge räumliche Beziehung zwischen Mastzellen und Neuronen beiträgt (Detailerläuterung und Literatur siehe obigen Text).

4.6.3 Regulation der Mastzellaktivität

Mastzellen, die in vegetativen Ganglien schlagartig degranulieren, können weder eine intensitätsmäßig determinierte noch zielgerichtete neuronale Beeinflussung und Steuerung von Schrankenstrukturen bewirken. Sie würden wahrscheinlich das Ganglion durch Induktion eines Ödems und massiver Entzündung schädigen. Bei sehr starker Intensität der Degranulation kann es sogar zur sog. Transgranulation kommen, d.h. zum Einschleusen von explosionsartig freigesetzten Mastzellgranula in die Nachbarzellen [Dines und Powell 1997]. Es stellt sich somit die Frage nach 1.) Möglichkeiten einer diskret regulierbaren Degranulation, 2.) einer Autoregulation der Mastzellaktivität sowie 3.) nach dem als normal einzuschätzenden Aktivierungszustand der Mastzelle.

Die meisten Mastzellen von adulten Rodentia, die sich im Bindegewebe oder in der Peritonealhöhle befinden, sind in der Tat ruhende Zellen, die ihre mitotische Aktivität eingestellt haben [Ginsburg und Lagunoff 1967]. Mastzellen besitzen zwei Modi der Degranulation. Zum einen können sie, getriggert über Brückenbindung von IgE-Molekülen auf der Zelloberfläche, eine explosionsartige Degranulation zeigen, zum anderen kann die Degranulation langsam und abgestuft erfolgen; letzterer Sekretionsprozess steht unter der Kontrolle Nicht-IgE-verwandter Stimuli [Dvorak et al. 1999] wie beispielsweise Neuropeptiden. Analog finden sich die Verhältnisse in den sympathischen Ganglien: Werden die residenten Mastzellen

immunologisch aktiviert, so kommt es wahrscheinlich zu einer heftigeren und auch einer Aktivierung sämtlicher Mastzellen, erfolgt jedoch eine neuropeptiderge, diskrete Ansteuerung der Mastzelle, so kann sie lokal parakrin ihre Umgebung beeinflussen.

Mastzellen besitzen H₃-Histaminrezeptoren, die über deren Aktivierung sie im Sinne von negativer Rückkopplung die eigene Histaminfreisetzung inhibieren [Ohkubo et al. 1994]. Eine Aktivierung von H₂-Autorezeptoren an Mastzellen inhibiert ebenfalls im Sinne einer negativen Rückkopplung die eigene Histaminfreisetzung [Göthert und Schlicker 2001]. Wahrscheinlich findet eine Autoregulation der Mastzellaktivität auch über das liberierte Serotonin statt: Die Endotoxin-induzierte Aktivierung der Mastzelle lässt sich über Blockade von 5-HT_{2A}-Rezeptoren inhibieren [Walther et al. 2002]. Durch die Produktion von Chemokinen werden mehrere Stunden nach Mastzellaktivierung Leukozyten angezogen, die Mediatoren der Mastzelle inaktivieren können [Wasserman 1979]. Die Aktivität der Mastzelle wird also in der Spätphase der allergischen Reaktion durch andere, chemotaktisch rekrutierte Entzündungszellen wie Leukozyten inhibiert - ein weiterer Regelkreis der Mastzellaktivität.

4.7 Die Mastzelle erregt serotonerg das sympathische Neuron

Serotonin löst bei etwa 70% der Neurone des Ganglion cervicale superius eine Depolarisation aus [Trendelenburg 1956]. Exzitatorische Effekte des Serotonins sind auch für das Ganglion stellatum bekannt [Haefely 1980]. Serotonin induziert in den Neuronen des Ganglion cervicale superius der Ratte auch eine konzentrationsabhängige Hyperpolarisation, die über einen 5-HT_{1A}-ähnlichen Rezeptor vermittelt wird, jedoch nicht über 5-HT₃-Rezeptoren [Ireland 1987; Ireland und Jordan 1987]. Diese serotonininduzierte Hyperpolarisation erweist sich als konzentrationsabhängig; wird jedoch eine bestimmte Schwelle der Serotoninkonzentration überschritten, so kommt es zur Ausbildung einer komplexen Antwort mit initialer Hyperpolarisation, gefolgt von einer Depolarisationsphase und anschließender Nach-Hyperpolarisation [Ireland 1987; Ireland et al. 1987]. Der erregende Effekt von Serotonin im Ganglion cervicale superius zeigt eine Tachyphylaxie und lässt sich nicht mittels Atropin (Blockade muskarinischer Acetylcholinrezeptoren) hemmen [Haefely 1980].

Interessanterweise sind sich die Serotoninrezeptoren, die die Depolarisation vermitteln, im Ganglion cervicale superius und N. vagus pharmakologisch sehr ähnlich [Ireland et al. 1987]. Durch Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren lässt sich auch beim N. vagus der Ratte konzentrationsabhängig eine Depolarisation hervorrufen [Nemoto et al. 2001]. Die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren führt zur Erregung von Neuronen des enterischen Nervensystems [Derkach et al. 1989]. Histamin-sensitive Afferenzen, die sich auch via 5-HT₃-Rezeptoren aktivieren lassen, kommen im proximalen Jejunum der Ratte vor; diese Fasern scheinen durch Mastzellen aktiviert zu werden [Kreis et al. 2002]. Degranulierende Mastzellen depolarisieren auch intrakardiale parasympathische Neurone und steigern deren Erregbarkeit [Powers et al. 2001].

Histamin erzeugt ebenfalls eine Depolarisation im Ganglion cervicale superius sowie im Ganglion stellatum, die über den H₁-Rezeptor vermittelt wird [Haefely 1980; Christian et al. 1989]. Diese Depolarisation tritt gleichermaßen durch exogenes wie durch Histamin aus endogenen Mastzellen auf [Christian et al. 1989]. Es besteht eine Kreuztachyphylaxie zwischen Serotonin und Histamin im Ganglion cervicale superius [Haefely 1980].

Interessanterweise hat der Neurotransmitter des postganglionären sympathischen Neurons, Noradrenalin, einen ausgeprägt inhibitorischen Effekt auf die Degranulation der zerebrovaskulären Mastzellen [Reynier-Rebuffel et al. 1997]. Hingegen zeigen der Transmitter des Parasympathikus und des präganglionären sympathischen Neurons, Acetylcholin, sowie die Neuropeptide SP und CGRP eine degranulationsinduzierende Wirkung [Reynier-Rebuffel et al. 1997]. Die zerebrovaskulären Mastzellen lassen sich synergistisch durch SP und CGRP zur Degranulation bringen [Reynier-Rebuffel et al. 1994]. Die Mastzellen in sympathischen und parasympathischen Ganglien, in denen jeweils Acetylcholin als Transmitter vorkommt, können wahrscheinlich in Analogie zu den zerebrovaskulären Mastzellen neurogen aktiviert bzw. deaktiviert werden - und somit kann aufgrund ganglionärer Aktivität eine Serotoninausschüttung stattfinden.

In Kultur können Neurone des Sympathikus Serotonin unter bestimmten Bedingungen selbst sezernieren und somit möglicherweise als Transmitter einsetzen [Sah und Matsumoto 1987]. So findet man in Neuronen des Ganglion cervicale superius der Ratte in der frühen Embryonalentwicklung und in Kultur eine Immunreaktivität gegen Serotonin, die besonders intensiv an den Fortsätzen der Neurone, also an Axonen und Dendriten zu erkennen ist [Soinila et al. 1986, 1987; Sah und Matsumoto 1987]. Interessanterweise findet sich dort in den eigenen Untersuchungen auch der flächenmäßig größte Teil der 5-HT₃-Rezeptoren. In der weiteren Ontogenese verschwindet diese Serotonin-Immunreaktivität wieder; die Regulation der Serotonin-Immunreaktivität erfolgt wahrscheinlich unabhängig von der Katecholaminsynthese [Soinila et al. 1986, 1987]. Der 5-HT₃-Rezeptor zählt ebenfalls zur physiologischen Ausstattung von Neuronen des Ganglion cervicale superius; die Zahl der 5-HT₃-Rezeptoren steigt bis zum 21. Tag der Embryonalentwicklung stetig an [Rosenberg et al. 1997]. Serotonin kann somit neben Acetylcholin als physiologischer Ko-Transmitter sympathischer Ganglien aufgefasst werden, der mindestens in einem bestimmten ontogenetischen Stadium funktionell aktiv ist.

Überdies existieren in den sympathischen Ganglien Transportsysteme zur zellulären Wiederaufnahme der biogenen Amine. Die meisten Neurone im Ganglion cervicale superius der Ratte exprimieren zwei Monoamintransporter: Der Norepinephrintransporter wird von den meisten Neuronen und der Serotonintransporter etwa von 30% der Neurone auf mRNA-Ebene exprimiert [Nishimura et al. 1999].

4.8 Die Mastzelle als Modulator neuronaler Aktivität

4.8.1 Neuronale Langzeitpotenzierung

Wenn zwei Reize über dieselbe Elektrode an ein sympathisches Ganglion der Ratte abgegeben werden, modifiziert offenbar der erste Reiz („Konditionierung“), abhängig vom Zeitintervall zwischen beiden Reizen, die Antwort auf den zweiten [Dunant und Dolivo 1968]. Reizt man die Neurone somit repetitiv, dann steigt bei Erhöhung der Reizfrequenz die Amplitude des postsynaptischen Potenzials überproportional bezüglich der Frequenzzunahme des präsynaptischen Reizes [Dunant und Dolivo 1968]. Die hierbei aufgetretene Plastizität der Synapsen wird als LTP neuronaler Aktivität bezeichnet; sie tritt bei einem präsynaptischen Stimulus im Bereich von 5 Hz für eine Dauer von 5 sec. und bei bis zu 20 Hz für eine Dauer von 20 sec. auf. Diese Bedingungen liegen in der physiologischen Größenordnung von präganglionärer Aktivität [Briggs et al. 1985a, 1985b; Libet und Mochida 1986; Briggs und McAfee 1988; Gonzáles Burgos et al. 1997]. Dabei bleibt die Schwelle der neuronalen Erregbarkeit (Potenz) unberührt, es ändert sich jedoch das Ausmaß der Antwort der erregten Struktur auf einen konstant gebliebenen Reiz (Effizienz) [Alkadhi und Altememi 1997]. So geht die Potenzierung neuronaler Aktivität weder mit einer Änderung des ganglionären Eingangswiderstandes, noch von Zellpotenzialen einher [Briggs und McAfee 1988]. Die Höhe und Dauer der LTP sind abhängig von Frequenz und Dauer der präsynaptischen Stimulation [Briggs et al. 1985a]. Eine Langzeitpotenzierung synaptischer Übertragung wird wahrscheinlich auch über einen Teil der SIF-Zellen vermittelt, die über Dopamin wirken [Libet und Mochida 1986]. Man unterscheidet bei der synaptischen Plastizität eine LTP, die mindestens 30 Minuten dauert, von einer STP (short-term potentiation), die kürzer als 30 Minuten besteht [Albuquerque et al. 1997; Aileru et al. 2001]. Für die STP wird oft der Begriff der PTP (post-tetanic potentiation) synonym verwendet [Aileru et al. 2001], der das auf einen tetanischen Stimulus folgende Auftreten der synaptischen Plastizität für wenige Minuten impliziert. Typischerweise persistiert die LTP jedoch für mehrere Stunden [Albuquerque et al. 1997; Aileru et al. 2001]. Der Abfall der LTP im Ganglion cervicale superius der Ratte folgt einer Kinetik erster Ordnung bei einer mittleren Zeitkonstante von 80 Minuten [Brown und McAfee 1982].

Die Form der aktivitätsabhängigen LTP ist eine Erscheinung an der Präsynapse in sympathischen Ganglien von Mammalia [Briggs und McAfee 1988; Aileru et al. 2001] und ist unabhängig von der cholinergen Aktivierung der Postsynapse [Briggs und McAfee 1988; Gonzáles Burgos et al. 1997]. Eine Blockade muskarinischer sowie nikotinischer Rezeptoren beeinflusst die LTP nicht [Brown und McAfee 1982; Briggs et al. 1985a; Briggs und McAfee 1988]. Trotzdem berichten Morales et al. [1994], dass der Hauptmechanismus der LTP im Ganglion cervicale superius eine Steigerung der postsynaptischen Erregbarkeit sei. So findet man neben einer LTP des postsynaptischen Potenzials auch eine Potenzierung der stimulierten Acetylcholin-Ausschüttung [Briggs et al. 1985b]. Letztlich bleibt die Zuordnung einiger Komponenten der LTP zu prä- oder postganglionären Strukturen unklar.

Die LTP ist assoziiert mit dem Gedächtnis und der Schmerzwahrnehmung [Albuquerque et al. 1997]; so weist die Langzeitpotenzierung neuronaler Aktivität zwischen Ganglion cervicale superius und dem Hippocampus sehr viele Gemeinsamkeiten auf [Alkadhi und Altememi 1997] und scheint, obwohl sie einst für ein einzigartiges Ereignis des Hippocampus gehalten wurde, eher eine generalisierte Eigenschaft synaptischer Funktionen zu sein [Brown und McAfee 1982]. Im Hippocampus des Meerschweinchens übt die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren einen inhibitorischen Einfluss auf die Höhe der tetanisch induzierten LTP aus [Maeda et al. 1994]. Mehr als 90% der den 5-HT₃-Rezeptor-exprimierenden Neurone im Cortex und Hippocampus sind GABAerge Neurone, so dass die Aktivierung dieses Serotoninrezeptors einen inhibitorisch-regulativen Einfluss ausübt [Morales et al. 1996a]. In hohen Dosen blockiert Serotonin hier auch die über den NMDA-Glutamat-Rezeptor vermittelte LTP [Staubli und Otaky 1994]. Ein wesentlicher Unterschied zum Hippocampus ist jedoch die im Ganglion cervicale superius essenziell notwendige Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren sowohl für die Induktions- als auch für die Aufrechterhaltungsphase der tetanisch induzierten LTP [Alkadhi et al. 1996; Alkadhi und Altememi 1997] (s. jeweils Abb. 4.4). Durch Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors vor tetanischer Stimulation des Ganglion cervicale superius lässt sich die Ausbildung der LTP verhindern [Alkadhi et al. 1996]. Die Darstellung der LTP-Höhe in Abhängigkeit von der experimentell eingesetzten Serotoninkonzentration zeigt eine Normalverteilung, d.h. die Antwort der LTP nimmt ab einer bestimmten Serotoninkonzentration wieder ab; der wahrscheinlichste Mechanismus hierfür ist eine schwellenabhängige Aktivierung LTP-inhibierender 5-HT₁-Rezeptoren [Alkadhi et al. 1996]. Die Aktivierung von 5-HT₂-Rezeptoren vermag die tetanisch induzierte LTP im Ganglion cervicale superius zu steigern, Antagonismus an diesem Rezeptor hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die LTP [Alkadhi et al. 1996]. So kann der 5-HT₂-Rezeptor funktionell als die LTP unterstützend, jedoch nicht als tragend angesehen werden. Histamin bewirkt neben einer H₁-Rezeptor-vermittelten Stimulation der ganglionären nikotinischen Übertragung [Christian und Weinreich 1992] auch eine STP (höchstens 10 Minuten) der synaptischen Effizienz [Weinreich et al. 1995; Albuquerque et al. 1997].

Stickstoffmonoxid (NO), einem membrangängigen Radikal, wird eine Rolle bei der parakrinen Informationsübertragung sowie bei Vorgängen der synaptischen Plastizität im Hippocampus zugeschrieben [Alkadhi und Altememi 1997]. NO kommt bei der Ratte in präganglionären Neuronen des Sympathikus vor [Okamura et al. 1995] und gehört zu den bei der Degranulation der Mastzelle liberierten Mediatoren [Andjelkovic und Pachter 1998]. NO ist im Ganglion cervicale superius der Ratte in der Lage, eine LTP der neuronalen Aktivität zu erzeugen, die über die lösliche Guanylatzyklase mit dem second messenger cGMP (zyklisches Guanodin-Monophosphat) vermittelt wird [Briggs 1992; Southam et al. 1996]. Cholinerge Agonisten erhöhen in verschiedenen Zelltypen des Ganglion cervicale superius den cGMP-Spiegel [Steinbusch et al. 1988], ebenso eine präganglionäre Stimulation, die auf dem Wege der NO-Synthese und des NO die Menge des cGMP steigert [Sheng et al. 1992]. Experimentell belegt ist die Notwendigkeit von

NO für die Aufrechterhaltungsphase der LTP im Ganglion cervicale superius bei der Ratte [Alkadhi und Altememi 1997; Altememi und Alkadhi 1999]. Im parasympathischen Ganglion ciliare des Huhns wird NO während der LTP produziert und freigesetzt; eine Hemmung der NO-Synthase unterbindet dort das Auftreten der LTP [Scott und Bennett 1993]. Die NADPH (Nicotinamid-adenin-dinucleotid-hydrogenphosphat)-Diaphorase-Aktivität gilt als Marker der neuronalen NO-Synthase, die in vielen Somata postganglionärer Neurone des Ganglion cervicale superius zu finden ist [Vanhatalo und Soynila 1994]. Zwischen 41% und 43% der SP- oder Somatostatin-immunreaktiven Neurone des Ganglion cervicale superius enthalten auch immunhistochemisch darstellbare cGMP-Immunreaktivität [Ariano und Tress 1983].

Die Hämoxxygenase (HO), ein Häm-katabolisierendes Enzym, erzeugt als Nebenprodukt CO (Kohlenmonoxid), dem als retrograder Neurotransmitter eine Rolle bei der LTP in bestimmten Hirnarealen wie dem Hippocampus zugeschrieben wird [Alkadhi et al. 2001]. Die neuronale Isoform der Hämoxxygenase (HO-2) findet sich ubiquitär in den Perikaryen und einigen Dendriten postganglionärer sympathischer Neurone, aber nicht in Axonen und deren Endigungen [Vollerthun et al. 1995]. Eine Blockade von 5-HT₃-Rezeptoren verhindert vollständig das Auftreten der LTP, in Anwesenheit von CO lässt sich die LTP auf diese Art jedoch nicht inhibieren [Alkadhi et al. 2001]. Die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren ist wahrscheinlich in die CO-Produktion eingebunden, und CO selbst vermittelt die Induktion der LTP [Alkadhi et al. 2001]. Die LTP neuronaler Aktivität hat somit auch eine postsynaptische Komponente, die von CO als Vermittlermolekül abzuhängen scheint. Die unmittelbare Einbindung des 5-HT₃-Rezeptors in die CO-Produktion ist zwar wahrscheinlich, bedarf aber weiterer Untersuchungen. In den eigenen Untersuchungen findet sich der 5-HT₃-Rezeptor ubiquitär an Neuronen lokalisiert, wobei die präganglionären Neurone nicht von den postganglionären unterschieden wurden. Nichtsdestotrotz findet sich Immunreaktivität gegen diesen Serotoninrezeptortyp an der Circumferenz und teilweise in geringerer Intensität im zytoplasmatischen Kompartiment der postganglionären Perikaryen. Somit lassen sich die neuropharmakologischen Untersuchungen von Alkadhi et al. [2001] mit den morphologischen Untersuchungen von Vollerthun et al. [1995] und den eigenen Ergebnissen ergänzen, womit eine 5-HT₃-Rezeptor-gesteuerte und CO-vermittelte postganglionäre Komponente der LTP naheliegt.

GABA (γ -Aminobuttersäure) bewirkt über GABA-A- und GABA-B-Rezeptoren eine Blockade der ganglionären Übertragung im Ganglion cervicale superius [González Burgos et al. 1994]. Dieser Transmitter vermag darüber hinaus die aktivitätsabhängige LTP über einen GABA-A-ähnlichen-Rezeptor zu blockieren [González Burgos et al. 1994, 1997]. Interessanterweise bewirkt die alleinige Applikation von Picrotoxin (ein GABA-Kanal-Blocker) einer Erleichterung der LTP-Induktion [González Burgos et al. 1997], so dass man von einem permanenten, wenn auch geringen Grundspiegel von GABA im Ganglion cervicale superius ausgehen kann, der offenbar eine überschießende oder zu leicht triggerbare LTP verhindert.

4.5) [Weinreich et al. 1995; Cavalcante de Albuquerque et al. 1996; Albuquerque et al. 1997]. Für diese Art der LTP ist eine spezifische immunologische Stimulation der ganglionären Mastzellen essenziell [Weinreich et al. 1995; Cavalcante de Albuquerque et al. 1996]. Die A-LTP ähnelt der oben beschriebenen neurogenen LTP (N-LTP) [Cavalcante de Albuquerque et al. 1996]. Beide Formen der LTP können im Ganglion cervicale superius koexistieren, ohne sich gegenseitig auszuschließen [Weinreich et al. 1995]. Während für die Ausbildung der N-LTP eine bestimmte präsynaptische, tetanische Stimulation (s. oben) erforderlich ist, lässt sich die A-LTP über einen weiten Bereich präsynaptischer Stimuli (0,016 - 3 Hz), bisweilen auch ganz ohne, triggern; die A-LTP ist somit eine von der ganglionären Aktivität unabhängige Form synaptischer Plastizität [Weinreich et al. 1995]. Die Stärke der A-LTP ist nicht von der Art der Sensibilisierung (aktiv oder passiv) des Versuchstieres abhängig; somit ist für ihr Auftreten der „afferente Schenkel“ des Immunsystems - die eigene Antikörperproduktion - nicht notwendig [Cavalcante de Albuquerque et al. 1996]. Alle Immunzellen und Mediatoren, die für das Auftreten der A-LTP notwendig sind, sind im Ganglion cervicale superius resident [Cavalcante de Albuquerque et al. 1996]. Nach Auslösung einer A-LTP sinkt die Zahl der mit Toluidinblau anfärbbaren Mastzellen signifikant [Weinreich und Udem 1987; Udem et al. 1990], was als morphologisches Korrelat des Degranulationsvorganges angesehen werden kann. Die Amplitude und Dauer der A-LTP lässt sich nicht durch Blockade von α - und β -Adrenozeptoren, muskarinischen und nikotinischen Cholinozeptoren, Glutamatrezeptoren, der Lipooxygenase und der Cyclooxygenase sowie von 5-HT₃-Rezeptoren in signifikanter Weise beeinflussen [Weinreich et al. 1995; Albuquerque et al. 1997]. Es wurde ferner gezeigt, dass Histamin nicht direkt an Vorgängen der A-LTP teilnimmt; auch eine Blockade von H_{1/2/3}-Rezeptoren sowie sättigende Histaminkonzentrationen (100-300 μ M) bleiben auf die A-LTP wirkungslos [Weinreich et al. 1995]. Weinreich und Udem [1987] berichten jedoch auch, dass Histamin für die Induktion der A-LTP mitverantwortlich sei. Eine Erklärung für die teilweise widersprüchlichen Wirkungen des Histamins im Ganglion cervicale superius bieten Christian und Weinreich [1992]: Eine Aktivierung des H₁-Rezeptors führt zur LTP neuronaler Aktivität, dagegen wirkt die Aktivierung des H₃-Rezeptors inhibierend auf die LTP. Diese gegensätzlichen Effekte finden an verschiedenen Synapsen statt [Christian und Weinreich 1992].

Die Abkömmlinge der Arachidonsäure PGD₂, PAF, Thromboxan und Endothelin-1 induzieren einzeln eine STP oder eine LTP im Ganglion cervicale superius von geringerem Ausmaß als die A-LTP [Albuquerque et al. 1997]. Die Mastzelldegranulation bewirkt einen 3-5fachen Anstieg der Arachidonsäuremetaboliten im Ganglion cervicale superius, was eine Beteiligung von PGD₂, PAF und Thromboxan bei der Entstehung der A-LTP nahelegt [Udem et al. 1990].

Wahrscheinlich kommt die A-LTP durch Synergismus verschiedener Mediatoren zustande, die dadurch erst für das Auftreten neuronaler Plastizität Bedeutung erlangen. Trotzdem lässt sich feststellen, dass im Falle der A-LTP eine immunologisch stimulierte Mastzelle auch via Entzündungsmediatoren neuronale Plastizität erzeugt. Die aktive Sensibilisierung auf ein spezifisches Antigen erfordert eine Zellkooperation

zwischen verschiedenen Immunzellen und der Mastzelle, die in sympathischen Ganglien resident sind. Die A-LTP ist ein eindrucksvolles Beispiel für die mastzellvermittelte Kooperation zwischen Immun- und Nervensystem. Man kann die Mastzelle hierbei gleichermaßen als Effektorzelle des Immunsystems wie auch als mobiler parakriner Neuromodulator ansehen.

Eine Mastzelldegranulation bewirkt auch im vagalen sensorischen Ggl. nodosum eine deutliche Depolarisation [Undem et al. 1993; Weinreich et al. 1997]; etwa ein Fünftel der C-Fasern des Ganglions zeigen eine langanhaltende Hyperpolarisation [Undem et al. 1993]. Mastzellmediatoren können somit während allergischer Reaktionen die Aktivität primärer C-Faser-Afferenzen modulieren [Undem et al. 1993]. Das ist eine interessante Parallele zwischen dem sympathischen Ganglion cervicale superius, das der Neuralleiste entstammt, und dem Ganglion nodosum, das plakodaler Herkunft ist [Rosenberg et al. 1997]. Die Mastzelle kann daher nicht nur die Aktivität sympathischer Ganglien und deren synaptischer Umschaltung auf multipolare, postganglionäre Neurone modulieren, sondern auch die pseudounipolaren sensiblen Neurone vagaler Ganglien, die in der Peripherie keine Umschaltung erfahren, beeinflussen.

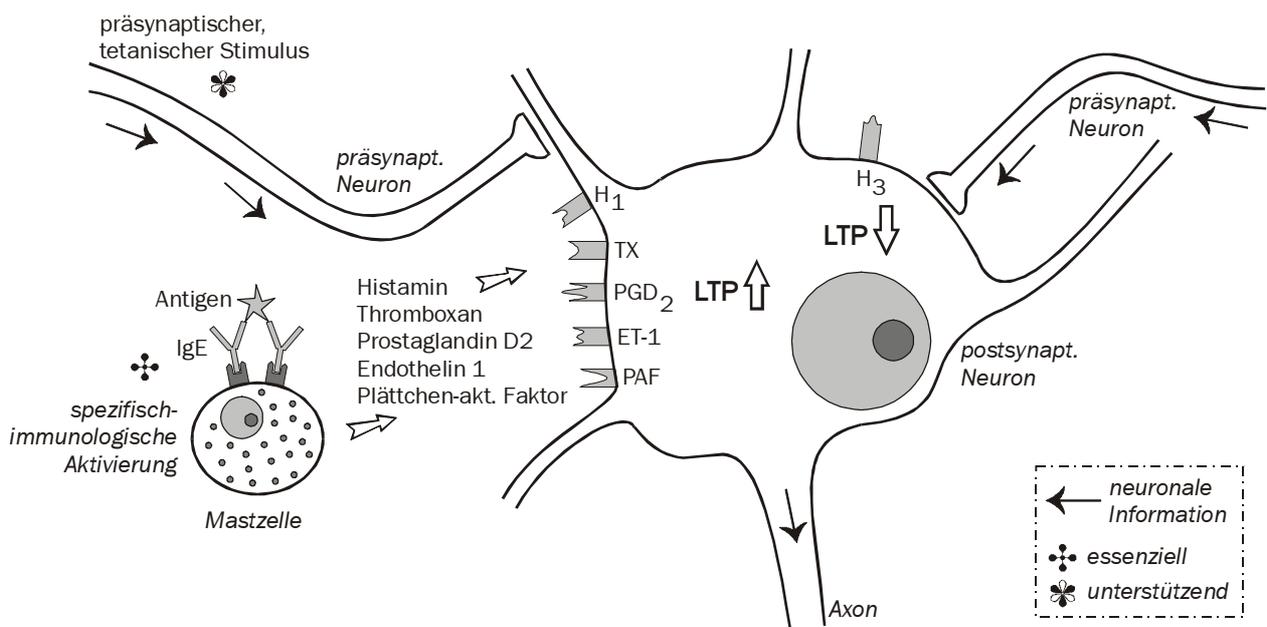


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Antigen-induzierten LTP im Ganglion cervicale superius. Die essenziell notwendig auf immunologische Weise aktivierte Mastzelle verursacht via Histamin und Arachidonsäurederivate eine Langzeitpotenzierung neuronaler Aktivität (Prä- und postganglionäre Komponenten der LTP sind im Schema nicht unterschieden).

4.9. Die Mastzelle als Regulator der Blut-Ganglien-Schranke

Die Mastzelle ist mit ihren spezifischen Membranrezeptoren dort im Organismus positioniert, wo potentiell Noxen einen Zugang gewinnen können; häufig liegt die Mastzelle in dem die Venulen einschneidenden Bindegewebe [Wasserman 1979; Galli 1993; Lydyard und Grossi 1995]. Da die Mastzelle im Gewebe bereits vor einem Noxeneintritt präsent ist und nicht speziell dorthin rekrutiert wird, ist zunächst sie die für die lokale Immunantwort prädestinierte Zelle [Wasserman 1979]. Man kann die Mastzelle in diesem Zusammenhang als stationären Teil des Immunsystems betrachten. Jedoch unterliegen die immunkompetenten Zellen des peripheren Nervensystems einschließlich autonomer Ganglien als Abkömmlinge des Knochenmarks einem raschen Wechsel; ihre Residenz in diesen Geweben ist als ein fortlaufend-dynamischer Prozess aufzufassen [Vass et al. 1993]. Wahrscheinlich ist die einzelne Mastzelle in den sympathischen Ganglien nur temporär resident; aufgrund eines sich einstellenden Fließgleichgewichtes bleibt jedoch ihre Zahl über die Zeit konstant.

Mastzellen migrieren im Laufe ihrer Entwicklung in unreifem Zustand aus dem Knochenmark in ihr Zielgewebe, um sich dort gemäß induktiven Einflüssen ihrer Mikroumgebung zu differenzieren [Kitamura et al. 1993]. Sie treten vornehmlich über die mittelgroßen Blutgefäße, mit denen sie in Verbindung bleiben [Silver et al. 1996], in das Hirngewebe über [Silverman et al. 2000]. So findet man sie vornehmlich perivaskulär lokalisiert in der Adventitia von Arteriolen und Venulen, jedoch nicht im Kapillarbett [Silver et al. 1996]. Mastzellen des Gehirns zeigen sich ultrastrukturell in Nestern nahe der Basallamina und glialen Fortsätzen gelegen [Silverman et al. 2000]. Untersuchungen mittels Intravitalfarbstoff markierter und sodann injizierter Mastzellen ergaben, dass diese eine Stunde post injectionem unter anderem nahe thalamischer Blutgefäße lokalisiert sind und dort bis zu einem Fünftel der Mastzellpopulation stellen [Silverman et al. 2000]. Ein Anstieg der Mastzellzahl in Teilen des Gehirns kann daher als Folge eines Migrationsvorganges aufgefasst werden [Silverman et al. 2000]. Perivaskuläre Mastzellen sind prinzipiell befähigt, durch ihre vasoaktiven Mediatoren und Zytokine die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu steigern [Theoharides et al. 1993; Dimitriadou et al. 2000]. Der Mechanismus, wie Mastzellen die Blut-Hirn-Schranke passieren können, ist zum großen Teil unklar [Silverman et al. 2000]. Bekannt ist jedoch, dass Mastzellen wie andere Zellen des Immunsystems Adhärenz an das Endothel zeigen und ein P-Selektin-abhängiges Rollen am Endothel durchführen können [Sriramarao et al. 1996].

Die Degranulation von Mastzellen, die im Hirnparenchym und den Leptomeningen lokalisiert sind, ist schon recht lange bekannt; Persinger [1983] induzierte deren Degranulation mittels Substanz 48/80 und untersuchte darauf mastzellreiche Gebiete wie den Thalamus und die Leptomeningen. Nach Applikation von Substanz 48/80 zeigt sich eine geringere Zahl mit Toluidinblau anfärbarer Mastzellen im Gehirn, deren Degranulation sich auch ultrastrukturell demonstrieren lässt, sowie ein vermehrter Übertritt eines Tracers über die Blut-Hirn-Schranke [Zhuang et al. 1996]. Die Degranulation von Mastzellen des Gehirns

stellt also einen Mechanismus zur regulierten, lokalen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke dar [Zhuang et al. 1996].

Am N. tibialis der Ratte bewirkt eine Stimulation der darin befindlichen Mastzellen eine tiefgreifende temporäre Permeabilitätsänderung der Blut-Nerven-Schranke sowie eine Änderung der Zusammensetzung endoneuraler Flüssigkeit, ohne dabei die Nervenleitung zu beeinflussen [Harvey et al. 1994]. Via 5-HT_{2A}-Rezeptoren kann die Mastzelle die Schwannschen Zellen und das Gefäßbett beeinflussen [Yoder et al. 1997]. Während der Wallerschen Degeneration degranulieren endoneurale Mastzellen auf der geschädigten Seite des Nerven, wobei sie aus ihren Granula Serotonin liberieren [Olsson 1965], das daraufhin die Permeabilität des Gefäßbetts erhöht [Harvey et al. 1994; Ullmer et al. 1995], hierdurch zum Ablauf einer Entzündungsreaktion und letztlich zur Gewebereparatur beiträgt [Harvey et al. 1994]. Die Mastzelle kann somit vaskuläre Schrankenstrukturen sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem steuern und öffnen.

Die Mastzellen des zentralen Nervensystems liegen gleichermaßen perivaskulär wie auch nahe an den Neuronen, so dass sie über direkte Nervenstimulation oder durch Neuropeptide aktiviert werden können [Theoharides et al. 1993]. Der Vorgang der neurogenen Entzündung (s. Abschnitt 4.6.2.2) kann als maßgebliches Beispiel für eine neuronal via Neuropeptide induzierte, mastzellvermittelte vaskuläre Permeabilitätsänderung mit Vasodilatation und Plasmaleckage gelten. Im Thalamus bewirkt Histamin, das aus Mastzellen und Neuronen stammt, via H₂-Rezeptoren eine Aktivierung der Adenylatzyklase im Endothel der Mikrozirkulation und führt auf diese Weise zur Induktion eines Hirnödems [Sztrika et al. 1987].

Zerebrale Mastzellen können neben einer direkten Beeinflussung auch über einen Leukozyten-abhängigen Mechanismus eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bewirken: Bringt man die Mastzellen mittels Substanz 48/80 zur Degranulation, so lässt sich in der Folge eine Adhäsion von Leukozyten am Endothel zerebraler Venulen beobachten [Mayhan 2000]. Wahrscheinlich vermitteln Entzündungsmediatoren und vasoaktive Substanzen der Mastzellen die Leukozytenaktivierung am Endothel [Mayhan 2000]; Perretti [1998] nennt hier besonders die biogenen Amine Histamin und Serotonin. Eine Blockade der Leukozytenadhäsion inhibiert in signifikanter Weise die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, so dass diese Adhäsion als wichtiges Ereignis betrachtet werden kann [Mayhan 2000]. In der Tat steigert unter anderem Histamin via H₁-Rezeptoren die Expression von P-Selektin des Endothels, was zur Plättchenaggregation und Leukozytenadhäsion und letztlich zur vaskulären Permeabilitätssteigerung führt [Kubes und Granger 1996; Perretti 1998; He et al. 2000].

Mastzellen sind zwar im Nervensystem resident, ihre Migration in dieses Gewebe ist als dynamischer Vorgang aufzufassen, der unter bestimmten Bedingungen auch sehr rasch ablaufen kann. Hierdurch bietet sich eine Erklärung für die interindividuell sehr unterschiedliche Mastzellzahl im zentralen Nervensystem von Ratten [Silver et al. 1996].

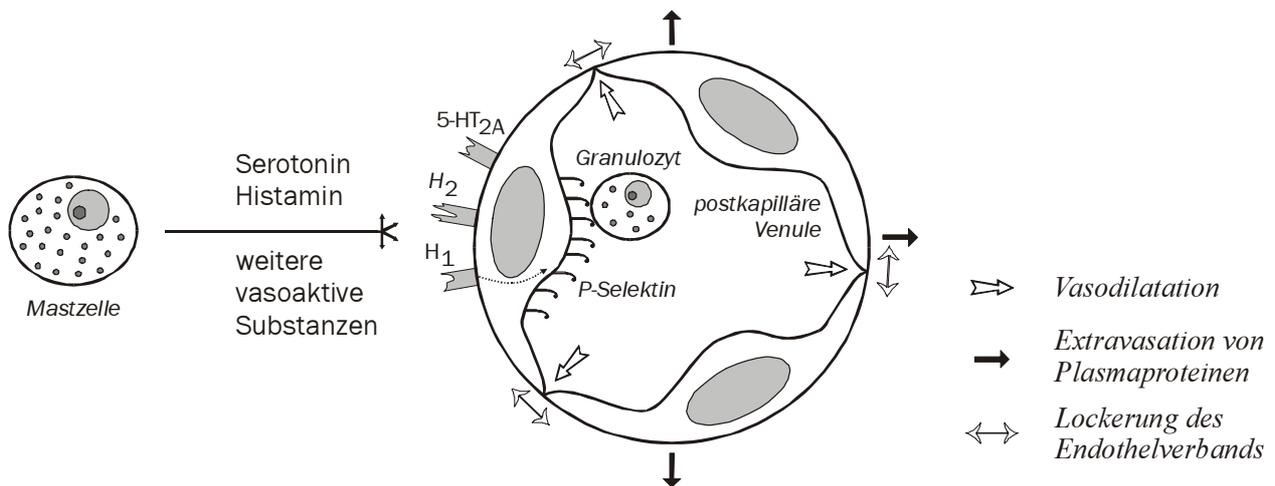


Abb. 4.6: Schematische Darstellung einer mastzellgesteuerten Blut-Ganglien-Schranke im Ganglion cervicale superius. Vornehmlich durch Serotonin und Histamin induziert, kommt es zur Vasodilatation und einer vaskulären Permeabilitäts-erhöhung sowie zur Expressionssteigerung von P-Selektin der Endothelzellen, wodurch auch eine Leukozyten-induzierte Öffnung der Schranke erfolgt.

Die Penetration von Immunglobulinen oder aktivierter Lymphozyten in das periphere Nervensystem sind Schlüsselereignisse für die Entwicklung immunologischer Krankheiten einschließlich Guillain-Barré-Syndrom, IgM-Neuropathie und chronisch-entzündliche demyelinisierende Polyradikuloneuropathie [Kanda et al. 1997]. Die Permeabilität der endothelialen Barriere ist bei der Entwicklung der Multiplen Sklerose (MS) von entscheidender Bedeutung, wo es zu einem Zusammenbruch der Barriere noch vor dem Auftreten jeglicher pathophysiologischer (etwa Infiltration durch Entzündungszellen) und klinischer Erscheinungen zu kommen scheint [Brosnan et al. 1990; Dimitriadou et al. 2000; Esposito et al. 2001]. Bei der MS penetrieren Immunzellen somit aus dem Blut in das Hirnparenchym [Theoharides et al. 1993]. Mastzellen sind häufig in der Umgebung von Läsionen der Multiplen Sklerose beschrieben [Theoharides 1990] und können in vitro mittels proteolytischer Enzyme Myelin degradieren [Theoharides et al. 1993]. Außerdem kann die Mastzelle weitere Entzündungszellen rekrutieren [Theoharides et al. 1993]. Die Degranulation von Mastzellen kann das Initialereignis einer Makrophagen-vermittelten Demyelinisierung sein [Powell et al. 1999]. Im experimentell-pathophysiologischen MS-Modell, der EAE (experimentelle autoimmunologische Encephalomyelitis) zeigt sich ein dreifacher Anstieg der Mastzellzahl in Hirnen erkrankter Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren; die Mastzellen sind - wie in den sympathischen Ganglien - bevorzugt um Venulen zu finden [Dimitriadou et al. 2000]. Wahrscheinlich ist das Auftreten rezidivierender MS-Attacken korreliert mit akuten, stressreichen Episoden [Theoharides et al. 1995; Esposito et al. 2001]. Untersuchungen mit einem radioaktiven Tracer zeigen, dass immobilisationsbedingter Stress zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke führt, und zwar in signifikanter Weise im Diencephalon und im Cerebellum [Esposito et al. 2001], wo sich auch die meisten Mastzellen des Gehirns befinden

[Dropp 1972; Esposito et al. 2001]. Dagegen bleibt die Integrität der Blut-Hirn-Schranke im Telencephalon weitgehend unberührt; hier sind Mastzellen nur selten zu finden [Dropp 1972; Esposito et al. 2001]. Diese Untersuchungen implizieren eine pathophysiologische Beteiligung der Mastzelle an entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems und deren Potenz, die Blut-Hirn-Schranke zu steuern.

In ihrer dominierenden Rolle soll die Mastzelle zur Aufrechterhaltung der Homöostase in der Mikrozirkulation beitragen [Pepys 1979]. Möglicherweise ist die Mastzelle die empfindlichste Zelle des Körpers bezüglich der Tonizität eines Mediums [Pepys 1979]. So spielt die Mastzelle eine Schlüsselrolle in der Hypoxie-induzierten Entzündung, bei der wahrscheinlich die Balance zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und NO für die Mastzellaktivierung entscheidend ist [Steiner et al. 2003]. Die Regulation des endoneuralen Milieus kann prinzipiell erfolgen durch 1.) die endoneuralen Gefäße, 2.) das Perineurium und 3.) die im Endoneuralraum befindlichen Zellen, zu denen auch die Mastzelle zählt [Weerasuriya 1987]. Auch Dyer [1978] betont die Bedeutung der Mastzelle für die Aufrechterhaltung des endoneuralen Milieus. In den sympathischen Ganglien liegt die Mastzelle bevorzugt an postkapillären Venulen, die den 5-HT_{2A}-Rezeptor tragen und via Serotonin der Mastzelle funktionell gesteuert werden können. Die Mastzelle zeigt auch eine bevorzugte Lage an der perineuralen Schranke, der jedoch der 5-HT_{2A}-Rezeptor fehlt. Mastzellen können aber möglicherweise die stark ausgeprägte mikropinozytotische Aktivität der Perineuralzellen modulieren [Dyer 1978]. Inwieweit die Mastzelle auf die perineurale Barriere mittels Serotonin wirken kann, lässt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht klären.

Die Satellitenzellen von autonomen Ganglien stellen möglicherweise generell für große Moleküle eine effektive Barriere dar [Ten Tusscher et al. 1989] und tragen häufig den 5-HT₃-Rezeptor. Somit liegt auch eine serotonerge Steuerung dieser „inneren“ Barriere durch die Mastzelle nahe.

5. Zusammenfassung

Das Vorkommen serotoninhaltiger Mastzellen in sympathischen Ganglien der Ratte ist bekannt. Das Vorkommen der Serotoninrezeptoren der Typen 2A und 3 ist aus verschiedenen Untersuchungen u.a. auf mRNA- und elektrophysiologischer Basis bekannt, nicht jedoch ihre zelluläre Lokalisation in den sympathischen Ganglien. In dieser Arbeit wurden im Ggl. cervicale superius und im Ggl. stellatum der Ratte 1.) die topographische Verteilung der Mastzellen innerhalb der Ganglien, eine mögliche topographische Beziehung zum Perineurium und zu den endoneuralen Gefäßen, 2.) das Vorkommen des Serotoninrezeptors 5-HT₃ an Neuronen, Satellitenzellen und cholinergen Synapsen sowie 3.) das Vorkommen des Serotoninrezeptors 5-HT_{2A} an Gefäßen immunhistochemisch untersucht.

Mit Hilfe der Primärantikörper gegen die folgenden in Klammern genannten Antigene wurden Mastzellen (Serotonin), 5-HT_{2A}-Rezeptoren, Endothelien und Perineurium (GluT-1) sowie selektiv Endothelien (RECA-1), Neurone (PGP 9.5), Satellitenzellen (Vimentin), 5-HT₃-Rezeptoren sowie cholinerge Synapsen (VACHT, Synaptophysin) markiert.

Es wurden neben einer Einfachmarkierung von Serotonin Doppelmarkierungen von Serotonin mit jeweils GluT-1 und RECA-1, eine Doppelmarkierung von GluT-1 und RECA-1 sowie des 5-HT_{2A}-Rezeptors und RECA-1 angefertigt; außerdem Doppelmarkierungen des 5-HT₃-Rezeptors jeweils mit PGP 9.5, VACHT, Synaptophysin und Vimentin. Danach erfolgte zur Quantifizierung eine überwiegend elektronische Bildvermessung und statistische Auswertung.

Pro Ganglion ließen sich 31 ± 22 serotoninpositive Mastzellen finden; Serotonin-Immunreaktivität war niemals an Neuronen, Glia und Gefäßen nachweisbar. Die Verteilung der Mastzellen erwies sich topographisch als homogen und übereinstimmend zwischen Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum. Auffällig war die ausgeprägte intra- und extraganglionäre Anhäufung der serotoninhaltigen Mastzelle im Bereich des Perineuriums; fast ein Viertel aller Mastzellen ließ sich unmittelbar dort lokalisieren. Die RECA-1-positiven Gefäße waren homogen in den sympathischen Ganglien verteilt und kamen häufiger als die GluT-1-positiven vor, die in bestimmten Regionen ohne erkennbare Regelmäßigkeit eine geringere Dichte aufwiesen. Auffallend war, dass sich die Mastzelle durchschnittlich 5 µm vom nächsten RECA-1-positiven Gefäß, jedoch 30 µm vom nächsten GluT-1-positivem Gefäß entfernt befand. Der Durchmesser des der Mastzelle nächstgelegenen Gefäßes betrug $22 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$; anhand des Wandaufbaus ließen sich die meisten dieser Gefäße als postkapilläre Venulen identifizieren. 5-HT_{2A}-Rezeptoren fanden sich an einem Teil der RECA-1-positiven Gefäße, der mit zunehmendem Kaliber signifikant stieg und die sich unter Einbeziehung der Wandstruktur als postkapilläre Venulen identifizieren ließen. Der 5-HT₃-Rezeptor ließ sich immunhistochemisch an Perikaryen, im Neuropil und an Satellitenzellen detektieren, jedoch nicht an cholinergen Präsynapsen. Alle Ergebnisse dieser Arbeit galten gleichermaßen für das Ganglion cervicale superius und das Ganglion stellatum der Ratte.

Mastzellen können in sympathischen Ganglien immunologisch und neuropeptiderg aktiviert werden. Eine Aktivierung von serotoninhaltigen Mastzellen durch die neuronal sezernierten Peptide SP und CGRP wurde u.a. für die Gl. lacrimalis sowie für die Mukosa des Magens beschrieben. SP wird im Ganglion cervicale superius in präganglionären Neuronen und in Kollateralen von unmyelinisierten sensiblen Fasern gefunden, die zu primär afferenten Neuronen gehören; SP ist in ihnen oft mit CGRP kolokalisiert.

Vornehmlich Endothelien von postkapillären Venulen tragen den 5-HT_{2A}-Rezeptor; eine serotonerge Permeabilitätssteigerung durch die Mastzelle ist somit möglich. Es ist prinzipiell bekannt, dass die Mastzelle beim peripheren Nerven via Serotonin auf die 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schwannschen Zellen und des Gefäßbettes wirken kann. Möglicherweise kann die Mastzelle auch serotonerg die Funktion der 5-HT₃-Rezeptor-tragenden Satellitenzellen beeinflussen und somit eine weitere, die Neurone direkt umgebende Barriere beeinflussen.

Serotonin löst im Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum eine Depolarisation aus und kann überdies neben Acetylcholin als physiologischer Kotransmitter in sympathischen Ganglien aufgefasst werden, der während der Entwicklung mindestens in einem ontogenetischen Stadium funktionell aktiv ist. Für die Induktions- und Aufrechterhaltungsphase der tetanisch induzierten LTP ist im Ganglion cervicale superius die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren sogar essenziell notwendig, so dass dem durch Mastzellen sezernierten Serotonin hierbei eine Schlüsselrolle zukommt. Außerdem ist bekannt, dass eine spezifisch-immunologische Aktivierung residenter Mastzellen die sog. Antigen-induzierte Langzeitpotenzierung auslöst, die durch Synergismus verschiedener Mediatoren außer Serotonin und Histamin zustandekommt und somit eine weitere Form mastzellinduzierter synaptischer Plastizität darstellt.

Schlussfolgerung: Lokalisation der Mastzellen und der 5-HT_{2A}- und 5-HT₃-Rezeptoren legen eine serotoninvermittelte Regulation der Gefäßpermeabilität und der neuronalen Erregbarkeit durch Mastzellen in sympathischen Ganglien nahe.

6. Summary

The occurrence of mast cells containing serotonin in sympathetic ganglia of the rat is commonly known. In this study the superior cervical and the stellate ganglion of the rat were analysed immunohistologically regarding (1) the topographical distribution of mast cells within the ganglia, a possible topographical connection with the perineurium and the endoneurial blood vessels, (2) the occurrence of the serotonin-receptor 5-HT₃ on neurons, satellite cells and cholinergic synapses as well as (3) the occurrence of the serotonin-receptor 5-HT_{2A} on blood vessels.

Using primary antibodies against the following antigens (in brackets) mast cells (Serotonin), 5-HT_{2A}-receptors, endothelia and perineurium (GluT-1), as well as selective endothelia (RECA-1), neurons (PGP 9.5), satellite cells (Vimentin), 5-HT₃-receptors and cholinergic synapses (VACHT, Synaptophysin) were labelled.

An average of 31 (SD=22) mast cells per ganglion could be found. Serotonin immune responses were found in no cases regarding neurons, glial-cells and blood vessels. Distribution of mast cells was topographically homogeneous and corresponding with the superior cervical and the stellate ganglion. The pronounced intra- and extraganglionic accumulation of serotonergic mast cells along the perineurium was remarkable. Almost one fourth of the mast cells was localized directly there. RECA-1-positive blood vessels were distributed homogeneously in the sympathetic ganglia and were more frequently found than those which were GluT-1-positive. The mast cell was found at an average distance of 5 µm from the next RECA-1-positive blood vessel, but 30 µm from the next GluT-1-positive blood vessel. The diameter of the blood vessel next to the mast cell was 22 µm (SD 10 µm). By means of the wall structure most of these blood vessels were identified as postcapillary venules. 5-HT_{2A}-receptors were found on a part of the RECA-1-positive blood vessels increasing significantly with the diameter of the blood vessels and being identified as postcapillary venules. The 5-HT₃-receptor could be immunohistologically detected on perikarya, within the neuropil and on satellite cells but not on cholinergic presynapses.

Mast cells can be activated in sympathetic ganglia immunologically as well as through neuropeptides (i.e. SP and CGRP). Predominantly endothelia of post-capillary venules carry 5-HT_{2A}-receptors; a serotonergic increase of permeability by the mast cell is therefore possible. It is commonly known that mast cells of the peripheral nerve may influence via serotonin 5-HT_{2A}-receptors of the Schwann-cells and the blood vessels. Possibly the mast cell influences by serotonin the function of satellite-cells carrying the 5-HT₃-receptor.

Serotonin causes a depolarisation within the superior cervical and stellate ganglia and can therefore be regarded as a physiological co-transmitter of sympathetic ganglia alongside Acetylcholine. For the phase of induction and the phase of maintenance of tetanic induced LTP within the superior cervical ganglion

the activation of 5-HT₃-receptors is even essential. Moreover it is known that specific immunological activation of resident mast cells causes the so-called antigen-induced LTP.

Conclusion: The localisation of mast cells and the 5-HT_{2A}- and 5-HT₃-receptors suggests a serotonin-moderated regulation of blood vessel permeability and of neuronal excitability through mast cells within sympathetic ganglia.

7. Veröffentlichungen zum Thema

1.) Frischholz C, Vollerthun R, Kummer W (2002): Immunhistochemische Lokalisation von serotoninhaltigen Mastzellen und Serotoninrezeptoren in sympathischen Ganglien der Ratte.

In: Kühnel W (ed.): Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. 97. Versammlung in Halle (Saale). Suppl. zum 184. Band des Anatomischen Anzeigers (Annals of Anatomy). 211-212

Abstract:

In sympathischen Ganglien ist das prinzipielle Vorkommen von Mastzellen bekannt. Sie sind an der Genese einer geänderten synaptischen Übertragung bei Allergie beteiligt, der genaue Wirkmechanismus und die Zielstrukturen ihrer Mediatoren sind nicht bekannt. In dieser Arbeit wurden im Ggl. cervicale superius und im Ggl. stellatum (N=18) der Ratte 1.) die topographische Verteilung der serotoninhaltigen Mastzellen innerhalb der Ganglien und 2.) die lokale Verteilung der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT₃ immunhistochemisch untersucht. Primärantikörper gegen RECA-1, GluT-1, Serotonin, Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT₃, VAcHT, Synaptophysin, Vimentin und PGP 9.5 wurden kombiniert, um Mastzellen (Serotonin), Neurone (PGP 9.5), Synapsen (VAcHT, Synaptophysin), Satellitenzellen (Vimentin), Endothelien (RECA-1) sowie das Perineurium (GluT-1) zu markieren. Abstände der Mastzellen zur perineuralen Barriere und zu Gefäßen definierter Größenklassen wurden vermessen. Topographisch zeigte sich eine ausgeprägte Anhäufung der Mastzellen am Perineurium und an postkapillären Venulen. Die 5-HT₃-Rezeptoren fanden sich größtenteils auf Neuronen, wobei das axonale Vorkommen das somatische übertraf; ferner waren diese Rezeptoren auf Satellitenzellen nachweisbar. Eine Kolokalisation von 5-HT₃-Rezeptoren und VAcHT bzw. Synaptophysin war nicht zu beobachten. Der Serotoninrezeptor 5-HT_{2A} war exklusiv an RECA-1-positiven Gefäßendothelien lokalisiert, und zwar bevorzugt an postkapillären Venulen, die anhand ihrer Wandstruktur und durch Kaliberbestimmung identifiziert wurden. Die topographische Lage der Mastzellen und das Vorkommen des Serotoninrezeptors 5-HT₃ an Neuronen und Glia sowie des Serotoninrezeptors 5-HT_{2A} an postkapillären Venulen lassen eine durch Mastzellen ausgelöste serotonerge Antigen-induzierte Langzeitpotenzierung sowie vaskuläre Permeabilitätserhöhung in den sympathischen Ganglien annehmen.

2.) Frischholz C, Kummer W, Vollerthun R: Nachweis serotoninpositiver Mastzellen und der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT₃ in cervicalen sympathischen Ganglien der Ratte. Eine immunhistologische, morphometrische Studie.

Manuskript abgeschlossen.

8. Literaturverzeichnis

- Aileru AA, De Albuquerque A, Hamlyn JM, Manunta P, Shah JR, Hamilton MJ, Weinreich D** (2001): Synaptic plasticity in sympathetic ganglia from acquired and inherited forms of ouabain-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: 635-644
- Akert K, Sandri C** (1976): The fine structure of the perineural endothelium. *Cell Tiss Res* 165: 281-295
- Albuquerque AA, Leal-Cardoso JH, Weinreich D** (1997): Role of mast cell- and non-mast cell-derived inflammatory mediators in immunologic induction of synaptic plasticity. *Braz J Med Biol Res* 30: 909-912
- Alkadhi KA, Al-Hijailan RS, Malik K, Hogan YH** (2001): Retrograde carbon monoxide is required for induction of long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *J Neurosci* 21: 3515-3520
- Alkadhi KA, Altememi GF** (1997): Nitric oxide mediates long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 753: 315-317
- Alkadhi KA, Salgado-Commissariat D, Hogan YH, Akpaudo SB** (1996): Induction and maintenance of ganglionic long-term potentiation require activation of 5-hydroxytryptamine (5-HT₃) receptors. *J Physiol* 496: 479-489
- Aloe L, Levi-Montalcini R** (1977): Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res* 133: 359-366
- Altememi GF, Alkadhi KA** (1999): Nitric oxide is required for the maintenance but not initiation of ganglionic long-term potentiation. *Neuroscience* 94: 897-902
- Andjelkovic AV und Pachter JS** (1998): Central nervous system endothelium in neuroinflammatory, neuroinfectious, and neurodegenerative disease. *J Neurosci Res* 51: 423-430
- Andres KH** (1961): Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. *Z Zellforsch* 55: 1-48
- Andres KH** (1967): Über die Feinstruktur der Arachnoidea und Dura mater von Mammalia. *Z Zellforsch* 79: 272-295
- Ariano MA, Tress EL** (1983): Co-localization of cyclic GMP in superior cervical ganglion with peptide neurotransmitters. *Brain Res* 289: 362-365
- Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD** (1987): Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Dev Brain Res* 36: 155-159
- Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B** (1997): Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378: 454-467
- Baluk P** (1997): Neurogenic inflammation in skin and airways. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2: 76-81
- Bani-Sacchi T, Barattini M, Bianchi S, Blandina P, Brunelleschi S, Fantozzi R, Mannaioni PF, Masini E** (1986): Release of histamine by parasympathetic stimulation in guinea pig auricle and rat ileum. *J Physiol* 371: 29-43
- Barnes P** (1995): The regulation of beta-adrenergic receptors. *Am J Resp Crit Care Med* 152: 842-843
- Batchelor KW, Cooper PH, Stanworth DR** (1979): The possible role of membrane located adenosine triphosphatases in mast cell triggering. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease. Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland (1979)*. Pitman Medical Publishing, UK. 47-52
- Bauer H, Sonnleitner U, Lametschwandtner A, Steiner M, Adam H, Bauer HC** (1995): Ontogenic expression of the erythroid-type glucose transporter (GluT 1) in the telencephalon of the mouse: correlation to the tightening of the blood-brain barrier. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86: 317-325

- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S** (1990): Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes care* 13: 198-208
- Ben Ari Y, Cherubini E, Aniksztejn L, Roisin MP, Charriaut-Marlangue C** (1989): Mechanism of induction of long term potentiation by the mast cell degranulating peptide. *Pharmacopsychiatry* 22: 107-110
- Bienenstock J, Blennerhassett MG, Tomioka M, Marshall J, Perdue MH, Stead RH** (1989): Evidence for mast cell / nerve interactions. In: Goetzl EJ, Spector NH (eds): *Neuroimmune networks: physiology and disease*. Liss, New York. 149-155
- Black IB** (1993): Vorstellungen einer speziellen Synapse: Definitionen und allgemeine Erläuterungen. In: Black IB (ed.): *Symbole, Synapsen und Systeme. Die molekulare Biologie des Geistes*. Spektrum, Heidelberg. 41-58
- Blennerhasset MG, Tomioka M, Bienenstock J** (1991): Formation of contacts between mast cells and sympathetic neurons in vitro. *Cell Tissue Res*. 265: 121-128
- Boado RJ, Pardridge WM** (1990): The brain type glucose transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 174-179
- Boczek-Funcke A, Dembowski K, Häbler H-J, Jänig W, McAllen RM, Michaelis M** (1992): Classification of preganglionic neurones projecting into the cat cervical sympathetic trunk. *J Physiol* 453: 319-339
- Bolz S, Farrell CL, Dietz K, Wolburg H** (1996): Subcellular distribution of glucose transporter (GluT-1) during development of the blood-brain barrier in rats. *Cell Tissue Res* 284: 355-365
- Bortz J, Lienert GA** (1998): *Kurzgefaßte Statistik für die klinische Forschung*. Springer (Berlin, Heidelberg, New York). 237-240
- Briggs CA** (1992): Potentiation of nicotinic transmission in the rat superior cervical sympathetic ganglion: effects of cyclic GMP and nitric oxide generators. *Brain Res* 573: 139-146
- Briggs CA, Brown TH, McAfee DA** (1985a): Neurophysiology and pharmacology of long-term potentiation in the rat sympathetic ganglion. *J Physiol* 359: 503-521
- Briggs CA, McAfee DA** (1988): Long-term potentiation at nicotinic synapses in the rat superior cervical ganglion. *J Physiol* 404: 129-44
- Briggs CA, McAfee DA, McCaman RE** (1985b): Long-term potentiation of synaptic acetylcholine release in the superior cervical ganglion of the rat. *J Physiol* 363: 181-190
- Brosnan CF, Claudio L, Tansey FA, Martiney J** (1990): Mechanisms of autoimmune neuropathies. *Ann Neurol* 27: 75-79
- Brostoff J, Hall T** (1995): Überempfindlichkeit - Typ-I-Reaktion. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK (eds.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme (Stuttgart, New York). 268-287
- Brown TH, McAfee DA** (1982): Long-term synaptic potentiation in the superior cervical ganglion. *Science* 215: 1411-1413
- Bugajski J, Gadek-Michalska A, Borycz J, Wieczorek E** (1994): Effect of crowding on corticosterone responses to central adrenergic stimulation. *Agents Actions* 41: C75-C76
- Buku A, Price JA, Mendlowitz M, Masur S** (2001): Mast cell degranulating peptide binds to RBL-2H3 mast cell receptors and inhibits IgE binding. *Peptides* 22: 1993-1998
- Burkel WE** (1967): The histological fine structure of perineurium. *Anat Rec* 158: 177-190
- Buzzi MG, Dimitriadou V, Theoharides TC, Moskowitz MA** (1992): 5-Hydroxytryptamine receptor agonists for the abortive treatment of vascular headaches block mast cell, endothelial and platelet activation within the rat dura mater after trigeminal stimulation. *Brain Res* 583: 137-149
- Buzzi MG, Moskowitz MA** (1992): The trigemino-vascular system and migraine. *Pathol Biol (Paris)* 40: 313-317
- Cavalcante de Albuquerque AA, Leal-Cardoso JH, Weinreich D** (1996): Antigen-induced synaptic plasticity in sympathetic ganglia from actively and passively sensitized guinea-pigs. *J Auton Nerv Syst* 61: 139-144
- Chakravarty NK** (1979): The metabolism of mast cells and biochemical changes associated with histamine release. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease*.

Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland (1979), Pitman Medical Publishing, UK. 38-46

- Chapman, GB** (1999): Occurrence of mast cells within bundles of myelinated and unmyelinated nerves in the rat tongue. *Anat Rec* 256: 347-353
- Christian EP, Udem BJ, Weinreich D** (1989): Endogenous histamine excites neurones in the guinea-pig superior cervical ganglion in vitro. *J Physiol* 409: 297-312
- Christian EP, Weinreich D** (1992): Presynaptic histamine H1 and H3 receptors modulate sympathetic ganglionic synaptic transmission in the guinea pig. *J Physiol* 457: 407-430
- Coombs RRA und Gell PGH** (1975): Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and diseases. In: Gell PGH, Coombs, Lachmann PJ (eds.): *Clinical aspects of immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 761-781
- Corson MA, Alexander RW, Berk BC** (1992): 5-HT₂ receptor mRNA is overexpressed in cultured rat aortic smooth muscle cells relative to normal aorta. *Am J Physiol Cell Physiol* 262: 309-315
- Dahlström A, Fuxe K** (1999): The autonomic nervous system and the histochemical fluorescence method for the microscopical localization of catecholamines and serotonin. *Brain Res Bull* 50: 365-367
- Dail WG, Barton S** (1983): Structure and organization of mammalian sympathetic ganglia. In: Elfvin L-G (ed.): *Autonomic Ganglia*. John Wiley & Sons Ltd.: 3-23
- Damon DH, D'Amore PA, Wagner JA** (1988): Sulphated glycosaminoglycans modify growth factor induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol* 135: 293-399
- Derkach V, Surprenant A, North RA** (1989): 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* 339: 706-709
- Dimitriadou V, Aubineau P, Taxi J, Seylaz J** (1987): Ultrastructural evidence for a functional unit between nerve fibres and type II cerebral mast cells in the cerebral vascular wall. *Neuroscience* 22: 621-630
- Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Reichler J, Theoharides TC** (1990): Histochemical and ultrastructural characteristics of rat brain perivascular mast cells stimulated with compound 48/80 and carbachol. *Neuroscience* 209-224
- Dimitriadou V, Pang X, Theoharides TC** (2000): Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associated brain mast cell activation. *Int J Immunopharmacol* 22: 673-684
- Dines KC, Powell HC** (1997): Mast cell interactions with the nervous system: relationship to mechanisms of disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 627-640
- Dobrogowska DH, Vorbrodth AW** (1999): Quantitative immunocytochemical study of blood-brain barrier glucose transporter (GLUT-1) in four regions of mouse brain. *J Histochem Cytochem* 47: 1021-1029
- Domeij S, Carlsöö B, Dahlqvist Å, Forsgren S** (1991): Occurrence of mast cells in relation to the distribution of nerve fibers in the rat larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111: 981-989
- Domeij S, Dahlqvist Å, Eriksson A, Forsgren S** (1996): Similar distribution of mast cells and substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibers in the adult human larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 105: 825-831
- Dropp JC** (1972): Mast cells in the central nervous system of several rodents. *Anat Rec* 174: 227-238
- Duffy SM, Lawley WJ, Conley EC, Bradding P** (2001): Resting and activation-dependent ion channels in human mast cells. *J Immunol* 167: 4261-4270
- Duijvestijn AM, van Goor H, Klatter F, Majoor GD, van Bussel E, van Breda Vriesman PJ** (1992): Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. *Lab Invest* 66: 459-466
- Dun NJ, Mo N, Jiang ZG, Saria A, Kiraly M, Ma RC** (1986): Peptides and transmission in mammalian sympathetic ganglia and spinal cord. In: *Abstracts des "International Colloquium on Nerv-*

- ous Transmission, Histochemistry and Cell Biology of Autonomic Neurones and Paraganglia". Heidelberg, 14. - 17.09.1986: 16
- Dunant Y, Dolivo M** (1968): Plasticity of synaptic functions in the excised sympathetic ganglion of the rat. *Brain Res* 10: 271-273
- Dvorak AM** (1999): Mast cell apoptosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 119: 72
- Dyck PJ, Karnes J, Lais A, Lofgren EP, Stevens JC** (1984): Pathological alterations of the peripheral nervous system in humans. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge PR (eds.): *Peripheral Neuropathy*. Saunders (Philadelphia): 760-870
- Dyer R** (1978): Endoneurial mast cells in peripheral nerves of the armadillo dermis. *Cell Tissue Res* 192: 97-105
- Ehrlich P** (1878): Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Dissertation. Universität Leipzig
- Ehrlich P** (1879): Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch Anat Physiol* 3: 166-169
- Elfvig LG, Hökfelt T, Goldstein M** (1975): Fluorescence microscopical, immunohistochemical and ultrastructural studies on sympathetic ganglia of the guinea pig, with special reference to the SIF cells and their catecholamine content. *J Ultrastruct Res* 51: 377-396
- Ellwood AJ, Curtis MJ** (1997): Involvement of 5-HT(1B/1D) and 5-HT2A receptors in 5-HT-induced contraction of endothelium-denuded rabbit epicardial coronary arteries. *Br J Pharmacol* 122: 875-884
- Enerbäck L, Olsson Y, Sourander P** (1965): Mast cells in normal and sectioned peripheral nerve. *Z Zellforsch* 66: 596-608
- Eränkö L** (1986): Milestones in SIF cell research. In: Abstracts des "International Colloquium on Nervous Transmission, Histochemistry and Cell Biology of Autonomic Neurones and Paraganglia". Heidelberg, 14. - 17.09.1986: 17
- Esposito P, Gheorghe D, Kandere K, Pang X, Connolly R, Jacobson S, Theoharides TC** (2001): Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res* 888: 117-127
- Falck B, Hillarp N-A, Thieme G, Torp A** (1962): Fluorescence of catecholamines and related compound condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 10: 348-354
- Farrell CL, Yang J, Pardridge WM** (1992): GluT-1 glucose transporter is present within apical and basolateral membranes of brain epithelial interfaces and in microvascular endothelia with and without tight junctions. *J Histochem Cytochem* 40: 193-199
- Farrell CL, Pardridge WM** (1991): Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelium luminal and abluminal membranes: An electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5779-5783
- Fetzer MH** (1978): Methodologische Studie zur quantitativen Analyse von Zellmustern im rostralen Hypothalamus des Meerschweinchens. Dissertation, Universität Gießen: 3-8
- Fewtrell CMS, Foreman C, Jordan CC, Oehme P, Renner H, Stewart JM** (1982): The effect of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. *J Physiol* 330: 393-411
- Foreman JC, Jordan CC** (1984): Neurogenic inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 5: 116-119
- Forssmann WG, Ito S, Weihe E, Aoki A, Dym DM, Fawcett DW** (1977): An improved perfusion fixation method for the testis. *Anat Rec* 188: 307-331
- Forssmann WG** (1964): Studien über den Feinbau des Ganglion cervicale superius der Ratte. *Acta anat* 59: 106-140
- Frazer A, Hensler JG** (1994): Serotonin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Molinoff PB (eds.): *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York: 283-308
- Fujimoto I, Oiki S, Kondo T, Katada T, Kato H, Taguchi T, Kasai M, Okada Y, Mikoshiba K, Ikenaka K** (1996): GTP-binding protein activation underlies LTP induction by mast cell degranulating peptide. *Neurosci Res* 25: 229-237
- Furness JB** (2000): Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81: 87-96

- Galli SJ** (1990): New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 62: 5-33
- Galli SJ** (1993): New concepts about the mast cell. *New Engl J Med* 328: 257-265
- Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X** (2000): Multiple mechanisms of fast excitatory transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81: 97-103
- Gamse R, Holzer P, Lembeck F** (1980): Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Brit J Pharmacol* 68: 207-213
- Gibbins IL** (1991): Vasomotor, pilomotor and secretomotor neurons distinguished by size and neurochemical content in superior cervical ganglia of mice. *J Auton Nerv Syst* 34: 171-184
- Gibbins IL** (1992): Vasoconstrictor, vasodilator and pilomotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs. *Neuroscience* 47: 657-672
- Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, Girgis S** (1985): Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci Lett* 57: 125-130
- Gibbins IL, Jobling P, Messenger JP, Teo EH, Morris JL** (2000): Neuronal morphology and the synaptic organization of sympathetic ganglia. *J Auton Nerv Syst* 81: 104-109
- Gibbins IL, Matthew SE, Bridgman N, Morris JL** (1996): Sympathetic vasoconstrictor neurons projecting from the guinea-pig superior cervical ganglion to cutaneous or skeletal muscle vascular beds can be distinguished by soma size. *Neurosci Lett* 213: 197-200
- Gibbins IL, Morris JL** (1990): Sympathetic neurons containing dynorphin but not neuropeptide Y innervate small cutaneous blood vessels of the guinea-pig. *J Auton Nerv Syst* 29: 137-150
- Gibson S, Miller HRP** (1986): Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases. *Immunology* 58: 101-104
- Ginsburg H, Lagunoff D** (1967): The in vitro differentiation of mast cells. *J Cell Biol* 35: 685-697
- Gisselmann G, Pusch H, Hovemann BT, Hatt H** (2002): Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nature neuroscience* 5: 11-12
- González Burgos GR, Biali FI, Cardinali DP** (1997): Picrotoxin-sensitive receptors mediate gamma-aminobutyric acid-induced modulation of synaptic plasticity in rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 751: 148-151
- González Burgos GR, Biali FI, Nicola Siri LC, Cardinali DP** (1994): Effect of gamma-aminobutyric acid on synaptic transmission and long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 658: 1-7
- Göthert M und Schlicker E** (2001): Pharmakologie des Histamins. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (eds.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban und Fischer (München und Jena): 231-240
- Göthert M und Starke K** (2001): Pharmakologie des Serotonins. *Pharmakotherapie primärer Kopfschmerzen*. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (eds.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban und Fischer (München und Jena): 219-229
- Green JP** (1994): Histamine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Molinoff PB (eds.): *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York: 309-319
- Haas N, Hamann K, Grabbe J, Niehus J, Kunkel G, Kolde G, Czarnetzki BM** (1997): Demonstration of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on Langerhans' cells of diseased nasal mucosa. *Allergy* 52: 436-439
- Haefely WE** (1980): 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and related indolealkylamines. In: Kharkevich DA (ed.): *Pharmacology of Ganglionic Transmission*. Springer (Berlin, Heidelberg, New York): 336-339
- Harvey GK, Toyka KV, Hartung HP** (1994): Effects of mast cell degranulation on blood-nerve barrier permeability and nerve conduction in vivo. *J Neurol Sci* 125: 102-109
- He P, Wang J, Zeng M** (2000): Leukocyte adhesion and microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: 1686-1694
- Heine H, Förster FJ** (1975): Histophysiology of mast cells in skin and other organs. *Arch Derm Res* 253: 225-228

- Heine H, Förster FJ, Schaeg G** (1975): Zur Histophysiologie der vegetativen Peripherie. Unter besonderer Berücksichtigung der Mastzellen. *Z Mikrosk Anat Forsch* 89: 948-960
- Heppelmann B, Messlinger K, Neiss WF, Schmidt RF** (1995): Fine sensory innervation of the knee joint capsule by group III and group IV nerve fibers in the cat. *J Comp Neurol* 351: 415-428
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL** (1997): International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacological Reviews* 49: 253-278
- Hökfelt T, Elfvin LG, Schulzberg M, Goldstein M, Nilsson G** (1977): On the occurrence of substance P containing fibers in sympathetic ganglia: immunohistochemical evidence. *Brain Res* 132: 29-41
- Hou XE, Dahlström A** (1996): Synaptic vesicle proteins in cells of the sympathoadrenal lineage. *J Auton Nerv Syst* 61: 301-312
- Ireland SJ** (1987): Origin of 5-hydroxytryptamine-induced hyperpolarization of the rat superior cervical ganglion and vagus nerve. *Br J Pharmacol* 92(2): 407-416
- Ireland SJ, Jordan CC** (1987): Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced hyperpolarization of the rat superior cervical ganglion. *Br J Pharmacol* 92(2): 417-427
- Ireland SJ, Straughan DW, Tyers MB** (1987): Influence of 5-hydroxytryptamine uptake on the apparent 5-hydroxytryptamine antagonist potency of metoclopramide in the rat isolated superior cervical ganglion. *Br J Pharmacol* 90: 151-160
- Ishizaka T** (1979): Membrane events in the triggering of mast cells. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease. Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland (1979)*, Pitman Medical Publishing, UK: 21-29
- Jänig W** (1988): Pre- und postganglionic vasoconstrictor neurons: differentiation, types and discharge properties. *Annu Rev Physiol* 50: 525-540
- Johnson AR, Erdös EG** (1973): Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides. *Proc Soc Exp Biol Med* 142: 1252-1256
- Kanda T, Iwasaki T, Yamawaki M, Ikeda K** (1997): Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin. *J Neurosci Res* 49: 769-777
- Kaufmann SHE** (2001): Immunologie. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (eds.): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer (Berlin, Heidelberg, New York): 47-136
- Kawai Y, Senba E** (2000): Spontaneous synaptogenesis in ex vivo sympathetic ganglion and the blockade by serum treatment. *J Comp Neurol* 424: 670-678
- Kawamoto K, Aoki J, Tanaka A, Itakura A, Hosono H, Arai H, Kiso Y, Matsuda H** (2002): Nerve growth factor activates mast cells through the collaborative interaction with lysophosphatidylserine expressed on the membrane surface of activated platelets. *J Immunol* 168: 6412-6419
- Kerjaschki D, Stockinger L** (1970): Zur Struktur und Funktion des Perineuriums. Die Endigungsweise des Perineuriums vegetativer Nerven. *Z Zellforsch* 110: 386-400
- Kiernan JA** (1975): A pharmacological and histological investigation of the involvement of mast cells in cutaneous axon reflex vasodilatation. *J Exp Physiol* 60: 123-130
- Kimura M, Tohya K, Toda S** (1988): An electron microscopical observation of the endoneurial mast cells of the laboratory musk shrew: *suncus murinus*. *Anat Anz* 165: 143-150
- Kiraly M, Favrod P, Matthews MR** (1989): Neuroneuronal interconnections in the rat superior cervical ganglion; possible anatomical bases for modulatory interactions revealed by intracellular horseradish peroxidase labelling. *Neuroscience* 33: 617-642
- Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, Matsuda H** (1993): Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci* 306: 185-191
- Kondo T, Ikenaka K, Fujimoto I, Aimoto S, Kato H, Ito K, Taguchi T, Morita T, Kasai M, Mikoshiba K** (1992): K⁺ channel involvement in induction of synaptic enhancement by mast cell degranulating (MCD) peptide. *Neurosci Res* 13: 207-216

- Kondo T, Ikenaka K, Kato H, Ito K, Aimoto S, Hojo H, Mikoshiba K.** (1990): Long-term enhancement of synaptic transmission by synthetic mast cell degranulating peptide and its localization of binding sites in hippocampus. *Neurosci Res* 8: 147-157
- Kowalski M, Kaliner MA** (1988): Neurogenic inflammation, vascular permeability and mast cells. *J Immunol* 140: 3905-3911
- Kreis ME, Jiang W, Kirkup AJ, Grundy D** (2002): Cosensitivity of vagal mucosal afferents to histamine and 5-HT in the rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: 612-617
- Kruger L, Sampogna SL, Rodin BE, Clague J, Brecha N, Yeh Y** (1985): Thin-fiber cutaneous innervation and its intraepidermal contribution studied by labeling methods and neurotoxin treatment in rats. *Somatosens Res* 2: 335-356
- Kubes P, Granger DN** (1996): Leucocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res* 32: 699-708
- Kummer W, Heym C** (1988): Neuropeptide distribution in the cervico-thoracic paravertebral ganglia of the cat with particular reference to calcitonin gene-related peptide immunoreactivity. *Cell Tiss Res* 252: 463-471
- Lambracht-Hall M, Dimitriadou V, Theoharides TC** (1990): Migration of mast cells in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 56: 151-159
- Le Filliatre G, Sayah S, Latournerie V, Renaud JF, Finet M, Hanf R** (2001): Cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *Br J Pharmacol* 132: 1581-1589
- Lembeck F, Holzer P** (1979): Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Arch Pharmacol* 310: 175-183
- Lethosalo JI, Uusitalo H, Laakso J, Palkama A, Härkönen M** (1984): Biochemical and immunohistochemical determination of 5-hydroxytryptamine located in mast cells in the trigeminal ganglion of the rat and guinea pig. *Histochemistry* 80: 219-223
- Leysen JE, Pauwels PJ** (1990): 5-HT₂ receptors, roles and regulation. In: Whitaker-Azmitia PM, Peroutka SJ (eds.): *The neuropharmacology of serotonin*. *Ann NY Acad Sci* 600: 183-193
- Liang Y, Jacobi HH, Reimert CM, Haak-Frendscho M, Marcusson JA, Johansson O** (2000): CGRP-immunoreactive nerves in prurigo nodularis - an exploration of neurogenic inflammation. *J Cutan Pathol* 27: 359-366
- Libet B, Mochida S** (1986): Synaptic long-term-enhancement (LTE), induced by preganglionic conditioning and mediated by dopaminergic SIF cells. In: *Abstracts des "International Colloquium on Nervous Transmission, Histochemistry and Cell Biology of Autonomic Neurones and Paragan-glia"*. Heidelberg, 14. - 17.09.1986: 40
- Lidegran M, Domeij S, Forsgren S, Dahlqvist Å** (1996): Mast cells in the laryngeal mucosa of the rat. *Acta Anat* 157: 135-143
- Lydvard P, Grossi C** (1995): Zellen der Immunantwort. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK (eds.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme (Stuttgart, New York): 12-30
- MacLean MR, Sweeney G, Baird M, McCulloch KM, Houslay M, Morecroft I** (1996): 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 119: 917-930
- Maeda T, Kaneko S, Satoh M** (1994): Inhibitory influence via 5-HT₃ receptors on the induction of LTP in mossy fiber-CA3 system of guinea-pig hippocampal slices. *Neurosci Res* 18: 277-282
- Magnani P, Cheria PV, Gould GW, Greene DA, Sima AA, Brosius FC** (1996): Glucose transporters in rat peripheral nerve: paranodal expression of GLUT1 and GLUT3. *Metabol Clin Exp* 45: 1466-1473
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA** (1994): Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8: 1003-1011
- Mantych GJ, Sotelo-Avila C, Devaskar SU** (1993): The blood-brain barrier glucose transporter is conserved in preterm and term newborn infants. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 46-49
- Martin H** (1977): *Der Abbildungsmaßstab in der Mikrofotografie*. *Mikroskopie (Wien)* 33: 320-328

- Matsuda H, Kawakita K, Kiso Y, Nakano T, Kitamura Y** (1989): Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J Immunol* 142: 927-931
- Matthews G, Neher E, Penner R** (1989): Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J Physiol* 418: 105-130
- Mayhan WG** (2000): Leucocyte adherence contributes to disruption of the blood-brain barrier during activation of mast cells. *Brain Res* 869: 112-120
- McKay DM, Bienenstock J** (1994): The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol today* 15: 533-538
- Moller K, Reimer M, Ekblad E, Hannibal J, Fahrenkrug J, Kanje M, Sundler F** (1997): The effects of axotomy and preganglionic denervation on the expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), galanin and PACAP type 1 receptors in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 775: 166-182
- Mongar JL, Foreman JC** (1979): Control of histamine secretion. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease. Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland (1979)*, Pitman Medical Publishing, UK: 30-37
- Moore DH, Ruska H** (1957): The fine structure of capillaries and small arteries. *J Biophys Biochem Cytol* 3: 457-462
- Morales M, Battenberg E, Bloom FE** (1998): Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT₃ receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 402: 385-401
- Morales M, Battenberg E, de Lecea L, Bloom FE** (1996a): The type 3 serotonin receptor is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Brain Res* 731: 199-202
- Morales M, Battenberg E, de Lecea L, Sanna PP, Bloom FE** (1996b): Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptor in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 36: 251-260
- Morales MA, Bachoo M, Collier B, Polosa C** (1994): Pre- and postsynaptic components of nicotinic long-term potentiation in the superior cervical ganglion of the cat. *J Neurophysiol* 72: 819-824
- Mori N, Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wada M, Teshima R, Bienenstock J, Nakanishi M** (2002): Nerve-mast cell (RBL) interaction: RBL membrane ruffling occurs at the contact site with an activated neurite. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: 1738-1744
- Mueckler M** (1994): Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219: 713-725
- Mutschler E** (1996): Gewebshormone. In: Mutschler E (ed.): *Arzneimittelwirkungen*. WVG (Stuttgart): 390-394
- Naukkarinen A, Jarvikallio A, Lakkakorpi J, Harvima IT, Harvima RJ, Horsmanheimo M** (1996): Quantitative histochemical analysis of mast cells and sensory nerves in psoriatic skin. *J Pathol* 180: 200-205
- Nemoto M, Endo T, Minami M, Yoshioka M, Ito H, Saito H** (2001): 5-Hydroxytryptamine (5-HT)-induced depolarization in isolated abdominal vagus nerves in the rat: involvement of 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 109: 217-230
- Newson B, Dahlström A, Enerbäck L, Ahlman H** (1983): Suggestive evidence for a direct innervation of mucosal mast cells. *Neuroscience* 10: 565-570
- Nishimura M, Sato K, Shimada S, Tohyama M** (1999): Expression of norepinephrine and serotonin transporter mRNAs in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res Mol Brain Res* 67: 82-86
- Ohkubo T, Shibata M, Inoue M, Kaya H, Takahashi H** (1994): Autoregulation of histamine release via the histamine H₃ receptor on mast cells in the rat skin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 328: 307-314
- Ohshiro H, Suzuki R, Furuno T, Nakanishi M** (2000): Atomic force microscopy to study direct neurite-mast cell (RBL) communication in vitro. *Immunol Lett* 74: 211-214
- Okamura H, Umehara K, Tadaki N, Hisa Y, Esumi H, Ibata Y** (1995): Sympathetic preganglionic neuron containing nitric oxide synthase and project to the superior cervical ganglion: combined application of retrograde neuronal tracer and NADPH-diaphorase histochemistry. *Brain Res Bull* 5: 491-494

- Olsson Y** (1965): Storage of monoamines in mast cells of normal and sectioned peripheral nerve. *Z Zellforsch* 68: 255-265
- Olsson Y** (1968): Mast cells in the nervous system. *Intern Rev Cytol* 24: 27-70
- Olsson Y** (1971): Mast cells in the human peripheral nerve. *Acta Neurol Scand* 47: 357-368
- Orte C, Lawrenson JG, Finn TM, Reid AR, Allt G** (1999): A comparison of blood-brain barrier and blood-nerve barrier endothelial cell markers. *Anat Embryol* 1999: 509-517
- Padawer J** (1979): Mast cell structure: Implications for normal physiology and degranulation. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease. Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland (1979)*, Pitman Medical Publishing, UK: 37-46
- Pannese E** (1960): Observation on the morphology, submicroscopic structure and biological properties of satellite cells (s.c.) in sensory ganglia of mammals. *Z Zellforsch* 52: 567-597
- Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH** (2001): The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 102: 937-944
- Pardridge WM, Boado RJ, Farrel CF** (1990): Brain-type glucose transporter (GluT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. *J Biol Chem* 265: 18035-18040
- Pauwels R, Van Der Straeten M** (1979): Drugs that modify mast cell function: their mode of action. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease. Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland (1979)*, Pitman Medical Publishing, UK: 61-75
- Pepys E** (1979): *The Mast Cell*. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease. Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland (1979)*, Pitman Medical Publishing, UK: 1
- Peroutka SJ, Schmidt AW, Sleight AJ, Harrington MA** (1990): Serotonin receptor "families" in the central nervous system: An overview. In: Whitaker-Azmitia PM, Peroutka SJ (eds.): *The neuropharmacology of serotonin*. *Ann NY Acad Sci* 600: 104-113
- Perretti M** (1998): Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmac* 31: 545-552
- Persinger MA** (1983): Degranulation of brain mast cells in young albino rats. *Behav Neural Biol* 39: 299-306
- Piera MJ, Beaughard M, Michelin MT, Winslow E, Massingham R** (1995): Lack of efficacy of 5-HT_{2A} receptor antagonists to reduce brain damage after 3 minutes of transient global cerebral ischaemia in gerbils. *Fundam Clin Pharmacol* 9: 562-568
- Pierce PA, Xie G-X, Levine JD, Peroutka SJ** (1996): 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: A polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70: 553-559
- Powell HC, Garrett RS, Brett FM, Chiang CS, Chen E, Masliah E, Campbell IL** (1999): Response of glia, mast cells and the blood brain barrier in transgenic mice expressing interleukin-3 in astrocytes, an experimental model for CNS demyelination. *Brain Pathol* 9: 219-235
- Powers MJ, Peterson BA, Hardwick JC** (2001): Regulation of parasympathetic neurons by mast cells and histamine in the guinea pig heart. *Auton Neurosci Bas Clin* 87: 37-45
- Ravetch JV, Kinet JP-P** (1991): Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9: 457-492
- Recklinghausen F von** (1863): Über die Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Virchows Arch Path Anat* 28: 157
- Reynier-Rebuffel AM, Callebert J, Launay JM, Seylaz J, Aubineau P** (1997): NE inhibits cerebrovascular mast cell exocytosis induced by cholinergic and peptidergic agonists. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: 845-850
- Reynier-Rebuffel AM, Mathiau P, Callebert J, Dimitriadou V, Farjaudon N, Kacem K, Launay JM, Seylaz J, Abineau P** (1994): Substance P, calcitonin gene-related peptide, and capsaicin release serotonin from cerebrovascular mast cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267: 1421-1429
- Rosenberg M, Pié B, Cooper E** (1997): Developing neonatal rat sympathetic and sensory neurons differ in their regulation of 5-HT₃ receptor expression. *J Neurosci* 17: 6629-6638

- Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambrecht-Hall M, Pang X, Theoharides TC** (1999): Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell–neuron interactions in vitro and in vivo. *Brain Res* 849: 1-15
- Rydning A, Lyng O, Aase S, Gronbech JE** (1999): Substance P may attenuate gastric hyperemia by a mast cell-dependent mechanism in the damaged gastric mucosa. *Am J Physiol* 277: 1064-1073
- Sah DW, Matsumoto SG** (1987): Evidence for serotonin synthesis, uptake, and release in dissociated rat sympathetic neurons in culture. *J Neurosci* 7: 391-399
- Schipper J, Tilders FJH** (1983): A new technique for studying specificity of immunocytochemical procedures: Specificity of serotonin immunostaining. *J Histochem Cytochem* 31: 12-18
- Schmelz M, Petersen LJ** (2001): Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci* 16: 33-37
- Scott TRD, Bennett MR** (1993): The effect of nitric oxide on the efficacy of synaptic transmission through the chick ciliary ganglion. *Br J Pharmacol* 110: 627-632
- Shanahan F, Denburg JA, Fox J, Bienenstock J, Befus AD** (1985): Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol* 135: 1331-1337
- Sheng H, Hughes ML, Murad F, Briggs CA** (1992): Evidence that nitric oxide mediates the cyclic GMP response to synaptic activity in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 597: 343-345
- Silver R, Silverman AJ, Vitkovi L, Lederhendler II** (1996): Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends Neurosci* 19: 25-31
- Silverman AJ, Sutherland AK, Wilhelm M, Silver R** (2000): Mast cells migrate from blood to brain. *J Neurosci* 20: 401-408
- Skofitsch G, Savitt JM, Jacobowitz DM** (1985): Suggestive evidence for a functional unit between mast cells and substance P fibres in the rat diaphragm and mesentery. *Histochemistry* 82: 5-8
- Sneddon JM** (1973): Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. In: Kerkut GA, Phillis JW (eds.): *Progress in Neurobiology*. Pergamon (Oxford): 151-198
- Soinila S, Ahonen M, Häppölä O, Päivärinta H, Eränkö L, Steinbusch H, Joh TH** (1987): 5-Hydroxytryptamine in developing sympathetic tissue. In: Heym C (ed.): *Histochemistry and cell biology of autonomic neurons and paraganglia*. Exp Brain Res Ser 16; Springer (Berlin, Heidelberg, New York): 217-222
- Soinila S, Ahonen M, Häppölä O, Päivärinta H, Steinbusch H** (1986): 5-Hydroxytryptamine in developing sympathetic tissues. In: Abstracts des "International Colloquium on Nervous Transmission, Histochemistry and Cell Biology of Autonomic Neurones and Paraganglia". Heidelberg, 14. - 17.09.1986: 59
- Southam E, Charles SL, Garthwaite J** (1996): The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic plasticity in the rat superior cervical ganglion. *Br J Pharmacol* 119: 527-532
- Sriramarao P, Anderson W, Wolitzky BA, Broide DH** (1996): Mouse bone marrow-derived mast cells roll on P-selectin under conditions of flow in vivo. *Lab Invest* 74: 634-643
- Stadler BM** (1997): Allergie. In: von Gemsa D, Kalden JR, Resch K (eds.): *Immunologie*. Thieme (Stuttgart, New York): 235-250
- Starke K** (2001): Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (eds.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban und Fischer (München und Jena): 131-133
- Staubli U, Otaky N** (1994): Serotonin controls the magnitude of LTP induced by theta bursts via an action on NMDA-receptor-mediated responses. *Brain Res* 643: 10-16
- Stead RH** (1992): Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract. *Reg Immunol* 4: 91-99
- Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, Bienenstock J** (1987): Intestinal mucosal mast cells are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2975-2979

- Steinbusch HW, Wouterlood FG, de Vente J, Bol JG, Berkenbosch F** (1988): Immunohistochemical localization of monoamines and cyclic nucleotides. Their application in quantitative immunofluorescence studies and tracing monoaminergic neuronal connections. *Acta Histochem Suppl* 35: 86-106
- Steiner DR, Gonzales NC, Wood JG** (2003): Mast cells mediate the microvascular inflammatory response to systemic hypoxia. *J Appl Physiol* 94: 325-334
- Sztrihai L, Joo F, Szerdahelyi P** (1987): Histamine H₂-receptors participate in the formation of brain edema induced by kainic acid in rat thalamus. *Neurosci Lett* 75: 334-338
- Takata K, Hirano H, Kasahara M** (1997): Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int Rev Cytol* 172: 1-53
- Tam EK, Calónico LD, Nadel JA, McDonald DM** (1988): Globule leucocytes and mast cells in the rat trachea: Their number, distribution and response to compound 48/80 and dexamethasone. *Anat Embryol* 178: 107-118
- Ten Tusscher MP, Klooster J, Vrensen GF** (1989): Satellite cells as blood-ganglion cell barrier in autonomic ganglia. *Brain Res* 490(1): 95-102
- Theodosiou M, Rush RA, Zhou XF, Hu D, Walker JS, Tracey DJ** (1999): Hyperalgesia due to nerve damage: role of nerve growth factor. *Pain* 81: 245-255
- Theoharides TC** (1990): Mast cells: the immune gate to the brain. *Life Sci* 46: 607-617
- Theoharides TC, Dimitriadou V, Letourneau R, Rozniecki JJ, Vliagoftis H, Boucher W** (1993): Synergistic action of estradiol and myelin basic protein on mast cell secretion and brain myelin changes resembling early stages of demyelination. *Neuroscience* 57: 861-871
- Thomas PK, Olsson Y** (1984): Microscopic anatomy and function of the connective tissue components of peripheral nerve. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge PR (eds.): *Peripheral Neuropathy*. Saunders (Philadelphia): 97-120
- Tkaczyk C, Okayama Y, Metcalfe DD, Gilfillan AM** (2004): Fcγ receptors on mast cells: Activatory and inhibitory regulation of mediator release. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 133: 305-315
- Tomioka M, Stead RH, Nielsen L, Coughlin MD, Bienenstock J** (1988): Nerve growth factor enhances antigen and other secretagogue-induced histamine release from rat peritoneal mast cells in the absence of phosphatidylserine. *J Allerg Clin Immunol* 82: 599-607
- Trendelenburg U** (1956): The action of 5-hydroxytryptamine on the nictitating membrane and on the superior cervical ganglion of the cat. *Br J Pharmacol* 11: 74-80
- Tserentsoodol N, Shin BC, Koyama H, Suzuki T, Takata K** (1999): Immunolocalization of tight junction proteins, occludin and ZO-1, and glucose transporter GluT1 in the cells of the blood-nerve barrier. *Arch Histol Cytol* 62: 459-469
- Tyers MB** (1990): 5-HT₃-Receptors. In: Whitaker-Azmitia PM, Peroutka SJ (eds.): *The neuropharmacology of serotonin*. *Ann NY Acad Sci* 600: 194-205
- Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Löbberth H** (1995): Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett* 370: 215-221
- Undem BJ, Hubbard WC, Christian EP, Weinreich D** (1990): Mast cells in the guinea pig superior cervical ganglion: a functional and histological assessment. *J Auton Nerv Syst* 30: 75-88
- Undem BJ, Hubbard WC, Weinreich D** (1993): Immunologically induced neuromodulation of guinea pig nodose ganglion neurons. *J Auton Nerv Syst* 44: 35-44
- Vanhatalo S, Soinila S** (1994): NADPH-diaphorase activity and its colocalization with transmitters and neuropeptides in the postganglionic neurons of the rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 652: 107-112
- Vass K, Hickey WF, Schmidt RE, Lassmann H** (1993): Bone marrow-derived elements in the peripheral nervous system. An immunohistochemical and ultrastructural investigation in chimeric rats. *Lab Invest* 69: 275-282
- Verhofstad AAJ, Steinbusch HWM, Penke B, Varga J, Joosten HWJ** (1981): Serotonin-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion of the rat. Evidence for the existence of separate serotonin- and catecholamin-containing small ganglionic cells. *Brain Res* 212: 39-49

- Vliagoftis H, Dimitriadou V, Boucher W, Rozniecki JJ, Correia I, Raam S, Theoharides TC** (1992): Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 98: 398-409
- Vollerthun R, Höhler B, Kummer W** (1995): Guinea-pig sympathetic postganglionic neurones contain haem oxygenase-2. *NeuroReport* 7: 173-176
- Walther A, Peter C, Yilmaz N, Schmidt W, Martin E, Schmidt H** (2002): Influence of serotonin-receptor antagonism on mast cell activation during endotoxemia. *Pathophysiology* 8: 161-165
- Wang ZY, Keith IM, Beckman MJ, Brownfield MS, Vidruk EH, Bisgard GE** (2000): 5-HT_{5a} receptors in the carotid body chemoreception pathway of rat. *Neurosci Lett* 278: 9-12
- Wasserman SI** (1979): The Mast cell and the inflammatory response. In: Pepys J, Edwards AM (eds.): *The Mast Cell. Its role in health and disease. Proceedings of an International Symposium, Davos, Switzerland* (1979), Pitman Medical Publishing, UK: 9-20
- Watkins CJ, Newberry NR** (1996): Multiple 5-HT receptors in the guinea-pig superior cervical ganglion. *Br J Pharmacol* 117(1): 21-28
- Webber RH, Horn M, Heym C** (1987): Peptide immunohistochemistry of guinea pig lumbar sympathetic ganglia. In: Heym C (ed.): *Histochemistry and cell biology of autonomic neurons and paraganglia. Exp Brain Res Ser 16*; Springer (Berlin, Heidelberg, New York): 34-38
- Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ** (2000): Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Op Immunol* 12: 624-631
- Weerasuriya A** (1987): Permeability of endoneural capillaries to K, Na and Cl and its relation to peripheral nerve excitability. *Brain Res* 419: 188-196
- Weihe E, Tao-Cheng JH, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE** (1996): Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3547-3552
- Weinreich D, Moore KA, Taylor GE** (1997): Allergic inflammation in isolated vagal sensory ganglia unmasks silent NK-2 tachykinin receptors. *J Neurosci* 17: 7683-7693
- Weinreich D, Udem BJ** (1987): Immunological regulation of synaptic transmission in isolated guinea-pig autonomic ganglia. *J Clin Invest* 79: 1529-1532
- Weinreich D, Udem BJ, Taylor G, Barry MF** (1995): Antigen-induced long-term potentiation of nicotinic synaptic transmission in the superior cervical ganglion of the guinea-pig. *J Neurophysiol* 73: 2004-2016
- Wershil BK, Furuta GT, Lavigne JA, Choudhury AR, Wang ZS, Galli SJ** (1995): Dexamethasone or cyclosporin A suppress mast cell-leukocyte cytokine cascades. Multiple mechanisms of inhibition of IgE- and mast cell-dependent cutaneous inflammation in the mouse. *J Immunol* 154: 1391-1398
- Wiedenmann B, Franke WW** (1985): Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 1017-1028
- Williams RM, Bauce L, Lea RW, Singh J, Sharkey KA** (1996): Secretion and serotonin release in the isolated rat lacrimal gland: the effects of substance P and calcitonin gene-related peptide. *J Auton Nerv Syst* 61: 37-42
- Williamson DJ, Hargreaves RJ** (2001): Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc Res Tech* 53: 167-178
- Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J** (1994): Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience* 62: 327-331
- Wu SX, Zhu M, Wang W, Wang Y-Y, Lia Y-Q, Yew DT** (2001): Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett* 307: 183-186
- Yoder EJ, Tamir H, Ellisman MH** (1996): 5-Hydroxytryptamine 2A receptors on cultured rat schwann cells. *Glia* 17: 15-27
- Yoder EJ, Tamir H, Ellisman MH** (1997): Serotonin receptors expressed by myelinating Schwann cells in rat sciatic nerve. *Brain Res* 753: 299-308

- Yu S, Ding WG** (1998): The 45 kDa form of glucose transporter 1 (GluT1) is localized in oligodendrocyte and astrocyte but not in microglia in the rat brain. *Brain Res* 797: 65-72
- Zamboni L, De Martino C** (1967): Buffered picric acid-formaldehyde: A new, rapid fixative for electron microscopy. *J Cell Biol* 35: 148
- Zenker W** (1994): Peripheres Nervensystem. In: Drenckhahn D, Zenker W (eds.): Benninghoff. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban und Schwarzenberg (München): 648-651
- Zenker W, Neuhuber W** (1994): Autonomes (viszerales, vegetatives) Nervensystem. In: Drenckhahn D, Zenker W (eds.): Benninghoff. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban und Schwarzenberg (München): 628-647
- Zheng Y, Hirschberg B, Yuan J, Wang AP, Hunt DC, Ludmerer SW, Schmatz DM, Cully DF** (2002): Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *J Biol Chem* 277: 2000-2005
- Zhuang X, Silverman AJ, Silver R** (1996): Brain mast cell degranulation regulates blood-brain barrier. *J Neurobiol* 31: 393-403
- Zhuang X, Silverman AJ, Silver R** (1997): Mast cell number and maturation in the central nervous system: Influence of tissue type, location and exposure to steroid hormones. *Neuroscience* 80: 1237-1245

Tabelle 1: Abstand der Mastzelle zum Perineurium

Abstand der Mastzelle zum Perineurium [μm], negative Werte: extraganglionär, positive Werte: intraganglionär																		
Parameter	< (-150)	(-150) - (-131)	(-130) - (-111)	(-110) - (-91)	(-90) - (-71)	(-70) - (-51)	(-50) - (-31)	(-30) - (-11)	(-10) - 10	11 - 30	31 - 50	51 - 70	71 - 90	91 - 110	111 - 130	131 - 150	> 150	Summe
arith. Mittelwert																		
Anteil Mastz. [%]	1,7	0,8	2,5	1,7	2,5	3,3	5,0	10,8	24,2	9,2	5,0	5,8	4,2	5,8	1,7	2,5	13,3	100
Standardabweichung																		
Anteil Mastz. [%]	2,4	2,4	2,5	2,8	2,5	4,1	4,9	7,2	20,9	6,2	4,4	6,5	6,1	4,5	8,1	4,7	14,0	
95%-Konfidenz, UG																		
Anteil Mastz. [%]	0,2	-0,7	1,0	-0,1	1,0	0,8	2,0	6,4	13,2	5,3	2,3	1,8	0,4	3,0	-3,3	-0,4	4,6	
95%-Konfidenz, OG																		
Anteil Mastz. [%]	3,1	2,3	4,0	3,4	4,0	5,9	8,0	15,3	35,1	13,0	7,7	9,9	7,9	8,6	6,7	5,4	22,0	
Median																		
Anteil Mastz. [%]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	2,4	2,9	26,3	9,0	0,0	7,4	5,4	2,5	0,0	0,0	10,6	
1. Quartil																		
Anteil Mastz. [%]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,6	2,0	0,0	1,2	2,5	0,0	0,0	0,0	10,0	
3. Quartil																		
Anteil Mastz. [%]	1,2	0,0	2,4	3,8	2,4	5,2	8,7	9,0	37,5	11,3	4,8	10,0	9,0	7,3	1,2	1,2	20,5	
Minimum																		
Anteil Mastz. [%]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Maximum																		
Anteil Mastz. [%]	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	10,0	10,0	17,7	66,7	15,0	10,0	16,7	16,7	10,0	20,0	11,8	40,0	
Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien																		
Der jeweilige Anteil an Mastzellen bezieht sich auf alle intraganglionär und extraganglionär (bis max. 150 μm) gefundenen Mastzellen																		

Tabelle 2: Vermessung von Mastzelle, GluT-1- und RECA-1-positiven Gefäßen

	Abstand der RECA-1- pos.Gefäße untereinander [μm]	Abstand der Mastzelle zum nächsten GluT-1- pos. Gefäß [μm]	Abstand der Mastzelle zum nächsten RECA-1- pos. Gefäß [μm]	Durchmesser des der Mastzelle nächsten ($<20\mu\text{m}$) RECA-1-pos. Gefäßes [μm]
arith. Mittel:	56	30	5	22
Standardabweichung:	8	24	5	10
Median:	55	20	5	20
Minimum	40	0	0	8
Maximum	80	80	20	50
1. Quartil	50	11	0	15
3. Quartil	60	40	7	30
95%-Konfidenzintervall, Untergrenze	55	20	4	20
95%-Konfidenzintervall,Obergrenze	57	39	6	24
	Durchmesser der Mastzelle [μm]	Gefäßabstand / Durchmesser der Mastzelle	Abstand der Mastzelle zum RECA-1-pos. Gefäß / max. möglichen Abstand	Abstand der Mastzelle zum RECA-1-pos. Gefäß / halbmaximalen Abstand
arith. Mittel:	11	0,49	0,23	0,46
Standardabweichung:	3	0,46	0,21	0,43
Median:	10			
Minimum	5			
Maximum	20			
1. Quartil	9			
3. Quartil	13			
95%-Konfidenzintervall, Untergrenze	10			
95%-Konfidenzintervall,Obergrenze	12			

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

**Tabelle 3: Abstand der Mastzelle zum nächsten RECA-1-positiven Gefäß
und der RECA-1-positiven Gefäße untereinander**

Maß [µm]	Abstand zw. Mastzelle und dem nächsten RECA-1-pos. Gefäß				Abstand der RECA-1-positiven Gefäße untereinander								
	0 - 5	6 - 10	11 - 15	16 - 20	36 - 40	41 - 45	46 - 50	51 - 55	56 - 60	61 - 65	66 - 70	71 - 75	> 75
arith. Mittel:	64,9%	26,8%	4,1%	4,1%	3,1%	6,2%	31,8%	17,1%	25,6%	7,0%	7,0%	1,6%	0,8%
Standardabw.	18,3%	12,0%	3,3%	3,9%	4,7%	12,3%	37,0%	11,9%	21,1%	7,0%	8,0%	3,3%	1,6%
95%- Konfidenz-Intervall (KI)	7,2%	7,4%	2,1%	2,4%	2,9%	7,6%	16,2%	7,4%	9,2%	4,3%	5,0%	2,0%	1,0%
95%-KI, Untergrenze	57,8%	19,4%	2,1%	1,7%	0,2%	-1,4%	15,6%	9,7%	16,3%	2,7%	2,0%	-0,5%	-0,2%
95%-KI, Obergrenze	72,1%	34,2%	6,2%	6,5%	6,0%	13,8%	48,0%	24,4%	34,8%	11,3%	11,9%	3,6%	1,8%
Median	64,0%	32,7%	1,7%	0,0%	1,1%	6,3%	57,1%	22,1%	33,9%	5,2%	3,4%	0,0%	0,0%
1. Quartil	57,3%	26,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	35,4%	17,0%	19,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3. Quartil	66,4%	36,5%	4,6%	5,2%	4,3%	15,6%	65,6%	31,0%	46,1%	11,6%	9,2%	0,0%	0,0%
Minimum	52,0%	10,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	8,0%	12,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Maximum	85,0%	44,4%	8,0%	8,0%	11,8%	30,0%	116,7%	44,4%	56,0%	15,0%	20,0%	8,0%	4,0%

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

Tabelle 4: Kaliber des der Mastzelle nächstgelegenen RECA-1-positiven Gefäßes

Einschlußkriterium: Das Gefäß befindet sich max. 20µm von der Mastzelle entfernt

Kaliber des der Mastzelle nächstgelegenen RECA-1-positiven Gefäßes

Maß [µm]	1 - 5	6 - 10	11 - 15	16 - 20	21 - 25	26 - 30	31 - 35	36 - 40	41 - 45	46 - 50	Summe
Anzahl	0	9	29	18	16	15	3	3	1	3	97
Anteil	0,0%	9,3%	29,9%	18,6%	16,5%	15,5%	3,1%	3,1%	1,0%	3,1%	100,0%

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

Tabelle 5: Abstand der Mastzelle zum nächsten GluT-1-positiven Gefäß

Abstand der Mastzelle zum nächsten GluT-1-positiven Gefäß

Maß [µm]	0 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	Summe
Anzahl	10	8	7	4	5	2	1	37
Anteil	27,0%	21,6%	18,9%	10,8%	13,5%	5,4%	2,7%	100,0%

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

Ergebnisse

Tabelle 6a: Darstellung von Synaptophysin und des 5HT₃-Rezeptors

n = 36 Schnitte, 6 Ganglien

(alle Flächen in µm²)

Bildfläche: 33023 µm²

Maß	Fläche der Synapsen (Synaptoph. pos.)	Fläche der 5HT ₃ -Rezeptoren	Überschneidungsfläche 5HT ₃ -Rez. mit Synapsen	Überschneidung 5HT ₃ -Rez. mit Synapsen / Synapsenfläche	Überschneidungsfläche 5HT ₃ -Rez. mit Synapsen / 5HT ₃ -Rezeptorenfläche
St.Abw.	49	501	5	4,1%	0,3%
Mittelw.	121	1399	7	5,6%	0,5%
Median	111	1313	6	4,9%	0,4%
Min	33	845	0	0,7%	0,0%
Max	280	2718	25	22,2%	0,9%
1. Quartil	91	1117	4	3,6%	0,3%
3. Quartil	149	1501	8	6,5%	0,7%
95%-KI,U	105	1235	5	4,3%	0,4%
95%-KI,O	137	1563	8	6,9%	0,5%

Maß	Anzahl der Synapsen	Fläche einer Synapse	Verhältnis Synapsenfläche / Rezeptorenfläche	Anzahl der Synapsen, die sich mit 5HT ₃ -Rez. schneiden	Anteil der Synapsen, die sich mit 5HT ₃ -Rez. schneiden
St.Abw.	32	1	4,2%	5	4,1%
Mittelw.	84	2	9,3%	5	5,6%
Median	74	1	8,8%	4	4,9%
Min	27	1	2,0%	0	0,7%
Max	166	3	21,3%	28	22,2%
1. Quartil	63	1	7,3%	2	3,6%
3. Quartil	103	2	10,9%	6	6,5%
95%-KI,U	74	1	8,0%	3	4,3%
95%-KI,O	95	2	10,7%	7	6,9%

Maß	Verhältnis Synapsenfläche / Bildfläche	Verhältnis 5HT ₃ -Rezeptorenfläche / Bildfläche
St.Abw.	0,5%	1,5%
Mittelw.	0,5%	4,2%
Median	0,3%	4,0%
Min	0,1%	2,6%
Max	3,5%	8,2%
1. Quartil	0,3%	3,4%
3. Quartil	0,5%	4,5%
95%-KI,U	0,3%	3,7%
95%-KI,O	0,6%	4,7%

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

Ergebnisse

Tabelle 6b: Darstellung des VChT und des 5HT₃-Rezeptors

n = 36 Schnitte, 6 Ganglien		(alle Flächen in μm^2)		Bildfläche: 33023 μm^2	
Maß	Fläche der Synapsen (Synaptoph. pos.)	Fläche der 5HT ₃ -Rezeptoren	Überschneidungsfläche 5HT ₃ -Rez. mit Synapsen	Überschneidung 5HT ₃ -Rez. mit Synapsen / Synapsenfläche	Überschneidungsfläche 5HT ₃ -Rez. mit Synapsen / 5HT ₃ -Rezeptorenfläche
St.Abw.	43	302	3	2,0%	0,3%
Mittelw.	125	1136	5	4,4%	0,5%
Median	118	1104	5	4,2%	0,5%
Min	67	620	1	0,9%	0,1%
Max	242	1954	15	12,1%	1,3%
1. Quartil	94	919	4	3,1%	0,3%
3. Quartil	145	1272	7	5,5%	0,6%
95%-KI,U	111	1037	4	3,7%	0,4%
95%-KI,O	140	1235	6	5,0%	0,6%
Maß	Anzahl der Synapsen	Fläche einer Synapse	Verhältnis Synapsenfläche / Rezeptorenfläche	Anzahl der Synapsen, die sich mit 5HT ₃ -Rez. schneiden	Anteil der Synapsen, die sich mit 5HT ₃ -Rez. schneiden
St.Abw.	37	0	3,4%	2	2,0%
Mittelw.	89	1	11,3%	4	4,4%
Median	85	1	10,0%	3	4,2%
Min	39	1	6,1%	0	0,9%
Max	184	2	20,9%	12	12,1%
1. Quartil	57	1	9,3%	2	3,1%
3. Quartil	105	2	12,3%	5	5,5%
95%-KI,U	77	1	10,1%	3	3,7%
95%-KI,O	101	2	12,4%	5	5,0%
Maß	Verhältnis Synapsenfläche / Bildfläche	Verhältnis 5HT ₃ -Rezeptorenfläche / Bildfläche			
St.Abw.	1,3%	0,9%			
Mittelw.	0,9%	3,4%			
Median	0,4%	3,3%			
Min	0,2%	1,9%			
Max	4,9%	5,9%			
1. Quartil	0,3%	2,8%			
3. Quartil	0,6%	3,9%			
95%-KI,U	0,5%	3,1%			
95%-KI,O	1,4%	3,7%			

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

Ergebnisse

Tabelle7: Darstellung von PGP 9.5 und 5HT₃-Rezeptor

n = 36 Schnitte aus 6 Ganglien							(alle Flächen in µm ²)		Bildfläche: 33023 µm ²	
Maß	Fläche der Neurone	Fläche der Perikaryen	Fläche der Axone u.Dendriten	Fläche der 5HT ₃ -Rezeptoren	Überschneid.-fläche 5HT ₃ -Rez. mit Perikaryen	Überschneid.-fläche 5HT ₃ -Rez. mit Axonen u. Dendriten				
St.Abw.	1673	1036	1242	407	140	193				
Mittelw.	12516	6480	6036	1260	313	628				
Median	12304	6590	5811	1155	290	607				
Min	9097	4567	3724	680	71	270				
Max	17609	8765	10583	2571	700	1079				
1. Quartil	11739	5683	5368	987	227	502				
3. Quartil	13063	7123	6321	1344	361	721				
95%-KI,U	11970	6142	5631	1127	268	565				
95%-KI,O	13063	6819	6442	1393	359	691				
Maß	Überschneid.-fläche 5HT ₃ -Rez. mit Neuronen	Überschneid.-fläche 5HT ₃ -Rez. mit Neuronen / Neuronenfläche	Überschneid.-fläche 5HT ₃ -Rez. mit Perikaryen / Perikaryen-fläche	Überschneidung 5HT ₃ -Rez. mit Axonen u.Dendriten / Axon- u. Dendritenfläche	Anteil 5HT ₃ -Rez. auf Perikaryen / Gesamtrez. Fläche	Anteil 5HT ₃ -Rez. auf Axonen u.Dendriten / Gesamtrez. Fläche				
St.Abw.	415	2,9%	2,7%	3,6%	7,5%	12,8%				
Mittelw.	971	7,8%	5,1%	10,9%	25,0%	51,1%				
Median	898	7,4%	4,2%	10,6%	24,9%	48,3%				
Min	391	2,2%	1,4%	2,9%	4,8%	22,8%				
Max	2662	16,4%	14,2%	22,1%	39,3%	77,5%				
1. Quartil	732	6,0%	3,4%	9,4%	21,3%	43,0%				
3. Quartil	1092	8,8%	5,7%	12,0%	29,5%	58,6%				
95%-KI,U	835	6,8%	4,2%	9,7%	22,6%	47,0%				
95%-KI,O	1106	8,7%	5,9%	12,1%	27,5%	55,3%				
Maß	Anteil der 5HT ₃ -Rezeptoren an Gesamtfläche	Anteil der Neurone an Gesamtfläche	Anteil der Perikaryen an Neuronenfläche	Anteil der Axone / Dendriten an Neuronenfläche	Verh. der Rez. an Perikaryen / Rez. an Axonen / Dendriten					
St.Abw.	1,3%	5,1%	5,8%	5,8%	0,12					
Mittelw.	3,7%	37,9%	51,9%	48,1%	0,49					
Median	3,5%	37,3%	52,4%	47,6%	0,50					
Min	1,9%	27,5%	32,8%	37,8%	0,11					
Max	7,8%	53,3%	62,2%	67,2%	0,68					
1. Quartil	3,0%	35,5%	48,5%	44,5%	0,44					
3. Quartil	3,9%	39,6%	55,5%	51,5%	0,59					
95%-KI,U	3,3%	36,2%	50,0%	46,2%	0,45					
95%-KI,O	4,1%	39,6%	53,8%	50,0%	0,53					

Ergebnisse

Tabelle7: Darstellung von PGP 9.5 und 5HT₃-Rezeptor

(alle Flächen in μm^2)

Bildfläche: 33023 μm^2

Maß	Anzahl Neurone	5HT3-pos. Neurone	Anteil der 5HT3-pos. Neurone	5HT3-pos. Neurone mit Rez. im Zytoplasma	Anteil der Neurone mit 5HT3-Rez. im Zytoplasma
St.Abw.	3,0	2,7	4,8%	0,5	4,7%
Mittelw.	10,9	10,5	97,1%	0,4	3,7%
Median	12,0	11,0	100,0%	0,0	0,0%
Min	6,0	6,0	84,6%	0,0	0,0%
Max	16,0	15,0	100,0%	1,0	14,3%
1. Quartil	8,0	8,0	93,3%	0,0	0,0%
3. Quartil	13,0	12,0	100,0%	1,0	7,3%
95%-KI,U	9,9	9,6	95,6%	0,3	2,2%
95%-KI,O	11,9	11,4	98,7%	0,6	5,3%

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

Tabelle 8: Darstellung von RECA-1 und 5-HT_{2A}-Rezeptor

n = 36 Schnitte aus 6 Ganglien

(alle Flächen in μm^2)

Bildfläche: 33023 μm^2

Gewebe	Anzahl der Gefäße	Anzahl der 5HT _{2A} -pos. Gefäße	Verhältnis 5HT _{2A} -pos. Gefäße / Gefäße gesamt	Zahl der Gefäße, >50% des Umfangs mit 5HT _{2A} -Rez. besetzt	Verhältnis: >50% des Umfangs mit 5HT _{2A} -Rez. besetzt / 5HT _{2A} -pos. Gefäße gesamt
SCG	12,83 ± 3,79	3,22 ± 1,59	0,26 ± 0,11	2,11 ± 1,08	0,69 ± 0,20
Ggl. st.	12,56 ± 3,63	3,22 ± 1,26	0,26 ± 0,08	2,22 ± 1,26	0,66 ± 0,28
∅	12,69 ± 3,66	3,22 ± 1,42	0,26 ± 0,10	2,17 ± 1,16	0,67 ± 0,24

Anzahl der 5HT_{2A}-pos. Gefäße

Kaliber [μm]	1 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	91 - 100
SCG	26	14	9	5	3	1	0	0	0	0
Ggl. st.	27	15	7	6	2	1	0	0	0	0
Σ	53	29	16	11	5	2	0	0	0	0

Anzahl der RECA-1-pos. Gefäße

Kaliber [μm]	1 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	91 - 100
SCG	113	69	30	14	4	1	0	0	0	0
Ggl. st.	113	57	32	16	7	1	0	0	0	0
Σ	226	126	62	30	11	2	0	0	0	0

Verhältnis: Zahl der 5HT_{2A}-pos. Gefäße / Zahl der RECA-1-pos. Gefäße

Kaliber [μm]	1 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	91 - 100
SCG	23,0%	20,3%	30,0%	35,7%	75,0%	100,0%	/	/	/	/
Ggl. st.	23,9%	26,3%	21,9%	37,5%	28,6%	100,0%	/	/	/	/
Σ	23,5%	23,0%	25,8%	36,7%	45,5%	100,0%	/	/	/	/

SCG = Ganglion cervicale superius; Ggl. st. = Ganglion stellatum

Gewebe: Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, n = 6 Ganglien

10. Danksagung

Herzlichen Dank an alle, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. W. Kummer, Gf. Direktor des Institutes für Anatomie und Zellbiologie, danke ich für die Überlassung des Themas, die stetige Gesprächsbereitschaft und die ausgezeichnete Betreuung während der Abfassung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Vollerthun, der mir in menschlicher wie fachlicher Hinsicht jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihm verdanke ich unzählige konstruktive Anregungen während der Laborarbeit und der Abfassung der Arbeit.

Außerdem danke ich Frau Tamara Papadakis und Herrn Martin Bodenbenner für die gute Betreuung während der Laborarbeiten und Frau Karola Michael für die vielfältige Unterstützung bei der Arbeit am Mikroskop und im Fotolabor sowie bei der Erstellung der Präsentation für die 18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft vom 26.09. - 28.09.2001 in Würzburg.

11. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

12. Lebenslauf

Name: Frischholz, Christian

Geburtsdatum und -ort: 08.02.1977 in Gießen

Familienstand: ledig

Nationalität: Deutscher

Beruf: Arzt

Anschrift: Straubmühlweg, 97078 Würzburg

Eltern: Udo Frischholz, geb. am 07.05.1944, Techn. Beamter
Roswitha Frischholz, geb. Löw, geb. am 20.09.1945, Verw.-Ang.

Schulbildung:

1983 - 1987 Grundschole in Brandoberndorf

1987 - 1989 Orientierungsstufe in Brandoberndorf

1989 - 1996 Christian-Wirth-Schule Usingen, Gymnasium
Abitur am 20.06.1996

Zivildienst:

1996 -1997 in der integrativen Kindertagesstätte Weilburg der
Lebenshilfe Wetzlar-Weilburg e. V.

Studium: Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

06.09.1999 Ärztliche Vorprüfung

29.08.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04.04.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08.11.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Zweitstudium: Diplom-Studiengang Informatik
seit April 2004 an der Privaten Fernfachhochschule Darmstadt

Beruf:

11.11.2004 Approbation als Arzt

seit 01.01.2005 Wiss. Mitarbeiter mit ärztlichen Aufgaben an der
Neurologischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. K. Toyka) der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg