

Die sensible und sympathische Innervation der unteren Atemwege der Maus

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

vorgelegt von Quoc Thai Dinh
aus Saigon/Vietnam

Gießen 2001

Aus der Medizinischen Betriebseinheit
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Anatomie I
Leiter: Prof. Dr. med. W. Kummer
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Fischer

Gutachter: Prof. Dr. med. W. Vogel

Tag der Disputation: 14.01.2002

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
Cy	Cyanin
cGMP	cylisches Guanosinmonophosphat
ChAT	Cholin Acetyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
eNANC	exzitatorisches nicht-adrenerges- nicht-cholinerges System
EFS	elektrische Feldstimulation
FB	Fast blue
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
iNANC	inhibitorisches nicht-adrenerges- nicht-cholinerges System
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LTP	long term potentiation
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NK1-Rezeptor	Neurokinin-1-Rezeptor
NK2-Rezeptor	Neurokinin-2-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
O ₂	Sauerstoff
ONOOH	Peroxyntrosäure
PB	Phosphat buffer
PBS	phosphate buffered saline
PPT-A-Gen	Präprotachykinin-A-Gen
PPT-B-Gen	Präprotachykinin-B-Gen

RAR	rapidly adapting stretch receptor
RNS (NO°, ONOO ⁻)	reaktive Stickstoff Spezies (NO°, ONOO ⁻)
ROS (O ₂)	reaktive Sauerstoff Spezies (O ₂)
SAR	slowly adapting stretch receptor
SCG	Superior cervical ganglion
SP	Substanz P
TH	Tyrosin Hydroxylase
VIP	Vasoactives intestinales Polypeptid

Tab.1	Mediatoren	7
Tab. 2	Antikörper und Immunreagenzien	21
Tab. 3	Filter für die Auflichtfluoreszenz	22
Tab. 4	Anzahl von retrograd markierten Neuronen in vagalsensiblen Ganglien	24
Tab. 5	Anzahl von retrograd markierten Neuronen in sympathischen Ganglien	26
Tab. 6	Korrelation von SP-mit NOS-Immunreaktivität in retrograd markierten Neuronen der sensiblen Vagusganglien	30
Tab. 7	Korrelation von TH- mit NPY-Immunreaktivität in retrograd markierten sympathischen postganglionären Neuronen (SCG)	35
Tab. 8	Korrelation von TH- mit NPY-Immunreaktivität in retrograd markierten sympathischen postganglionären Neuronen (Ganglion stellatum)	39
Abb. 1	Übersicht über die Atemwegsinnervation	4
Abb. 2	Schema der Synthese der vom Prä-Pro-Tachykinin-A- Gen kodierten Tachykinine	9
Abb. 3	Biosynthese der Katecholamine	14
Abb. 4	Injektionsstellen	25
Abb.5a	Korrelation von SP-und NOS-Immunreaktivität in retrograd markierten Ganglienzellen des Ganglions jugulare/nodosum der Maus	28

Abb.5b	Korrelation von SP-und NOS-Immunreaktivität in retrograd markierten Ganglienzellen des Ganglions jugulare/nodosum der Maus	29
Abb. 6	Anteile von neuronalen Populationen an der sensiblen Atemwegsinnervation der Maus (Ggl.jug/nod)	31
Abb.7a	Immunhistochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neuronen der Maus (SCG)	33
Abb.7b	Immunhistochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neuronen der Maus (SCG)	34
Abb. 8	Anteile von neuronalen Populationen an der sympathischen Atemwegsinnervation der Maus (SCG)	36
Abb.9	Anteile der neuronalen Populationen an der sympathischen Atemwegsinnervation der Maus (Ggl. stellatum)	36
Abb.10a	Immunhistochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neurone der Maus (Ggl. stellatum)	37
Abb.10b	Immunhistochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neurone der Maus (Ggl. stellatum)	38
Abb.11	Korrelation von SP- und NOS-Immunreaktivität in den Nervenfasern der unteren Atemwege der Maus	41
Abb.12	Korrelation von TH- und NPY-Immunreaktivität in den Nervenfasern der unteren Atemwege der Maus	42

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Innervation der unteren Atemwege	1
1.1.1 Sympathische Innervation	1
1.1.2 Parasympathische Innervation	2
1.1.3 Sensible Innervation	5
1.2 Mediatoren	6
1.2.1 Tachykinine	7
1.2.2 Stickstoffmonoxid	9
1.2.3 Noradrenalin	12
1.2.4 Neuropeptid Tyrosin	14
1.3 Ziele und Fragestellungen	15
2. Material und Methoden	18
2.1 Versuchstiere	18
2.2 Retrograde neuronale Markierung	18
2.3 Gewebe	18
2.3.1 Gewebeparbeitung	19
2.4 Immunhistochemie	19
2.4.1 Doppelimmunfluoreszenz	19
2.4.2 Kontrollen	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Lokalisation retrograd markierter Neurone	24
3.1.1 Injektionsstellen	24
3.1.2 Sensible Ganglien	24
3.1.3 Sympathische Ganglien	26

3.2	Immunhistochemie von retrograd markierten Neuronen	26
3.2.1	Sensible Ganglien	26
3.2.2	Sympathische Ganglien	32
3.3	Korrelation von SP mit NOS bzw. von TH mit NPY in den zu den unteren Atemwegen projizierenden Nervenfasern der Maus	40
3.3.1	Korrelation von SP mit NOS	40
3.3.2	Korrelation von TH mit NPY	40
4.	Diskussion	43
4.1	Retrograde neuronale Markierung	43
4.1.1	Injektionsstellen	43
4.1.2	Sensible Ganglien	44
4.1.3	Sympathische Ganglien	45
4.2	Immunhistochemie von retrograd markierten Neuronen	45
4.2.1	Sensible Ganglien	45
4.2.2	Sympathische Ganglien	51
4.3	Korrelation von SP mit NOS bzw. von TH mit NPY in den zu den unteren Atemwegen projizierenden Nervenfasern	55
4.3.1	Korrelation von SP mit NOS	55
4.3.2	Korrelation von TH mit NPY	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturverzeichnis	61
7.	Veröffentlichung	81
8.	Lebenslauf	83
	Danksagung	84

1. EINLEITUNG

1.1 Innervation der unteren Atemwege

Die unteren Atemwege beginnen mit dem Kehlkopf und setzen sich über die Trachea und die beiden Hauptbronchien, Bronchus principales dexter und sinister, bis zu den Bronchioli terminales fort. Über das Vorkommen einiger Nervenfasern um die Bronchien wurde bereits von Thomas Willis (1681) berichtet. Heute ist bekannt, daß die Atemwege von zahlreichen Nervenfasern mit unterschiedlichem Ursprung innerviert werden. Die Nervenversorgung der unteren Atemwege wird nach klassischer Einteilung in ein autonomes efferentes System mit einem sympathischen und einem parasympathischen Anteil und in ein sensibles System gegliedert. Sympathische, parasympathische und sensible Nervenfasern vereinigen sich zu einem Nervengeflecht um die Atemwege, das an der Hinterwand der Trachea liegt und am Lungenhilus in die Lunge eintritt.

1.1.1 Sympathische Innervation

Sympathische präganglionäre Neurone liegen im Nucleus intermediolaterales und im Nucleus intercalatus des thorakalen Rückenmarks. Ihre Axone verlassen gemeinsam mit allen motorischen Fasern über die Vorderwurzel das Rückenmark und ziehen zu den prä- und paravertebralen Ganglien. Als Transmitter der präganglionären Neurone wurden neben Acetylcholin (Lindh et al. 1986) auch Stickstoffmonoxid (NO) gefunden (Blottner et al. 1992). Postganglionär sympathische Neurone ziehen vom Ganglion cervicale superius sowie vom Ganglion stellatum und oberen thorakalen Grenzstrangganglien zur Trachea und Lunge (s. Abb.1).

Neben den Katecholaminen wurden weitere Mediatoren in sympathischen Nervenfasern der unteren Atemwege beschrieben. Neuropeptid Y (NPY) wurde oft zusammen mit Katecholamin in sympathischen Nervenfasern um die Arterien, Arteriolen und in der glatten Bronchialmuskulatur der unteren Atemwege angetroffen (Lundberg et al. 1983a, Uddman et al. 1984). Sympathische Neurone, die zusätzlich NPY enthalten, projizieren zu den unteren Atemwegen (Kummer et al. 1992). Neuropeptid Y kommt teilweise gemeinsam mit Katecholamin oder mit Vasoaktivem Intestinalem Polypeptid (VIP) in sympathischen Nervenzellen mit Projektion zu den Atemwegen vor (Bowden et al. 1992) Die sympathische Innervation der Atemwege weist erhebliche

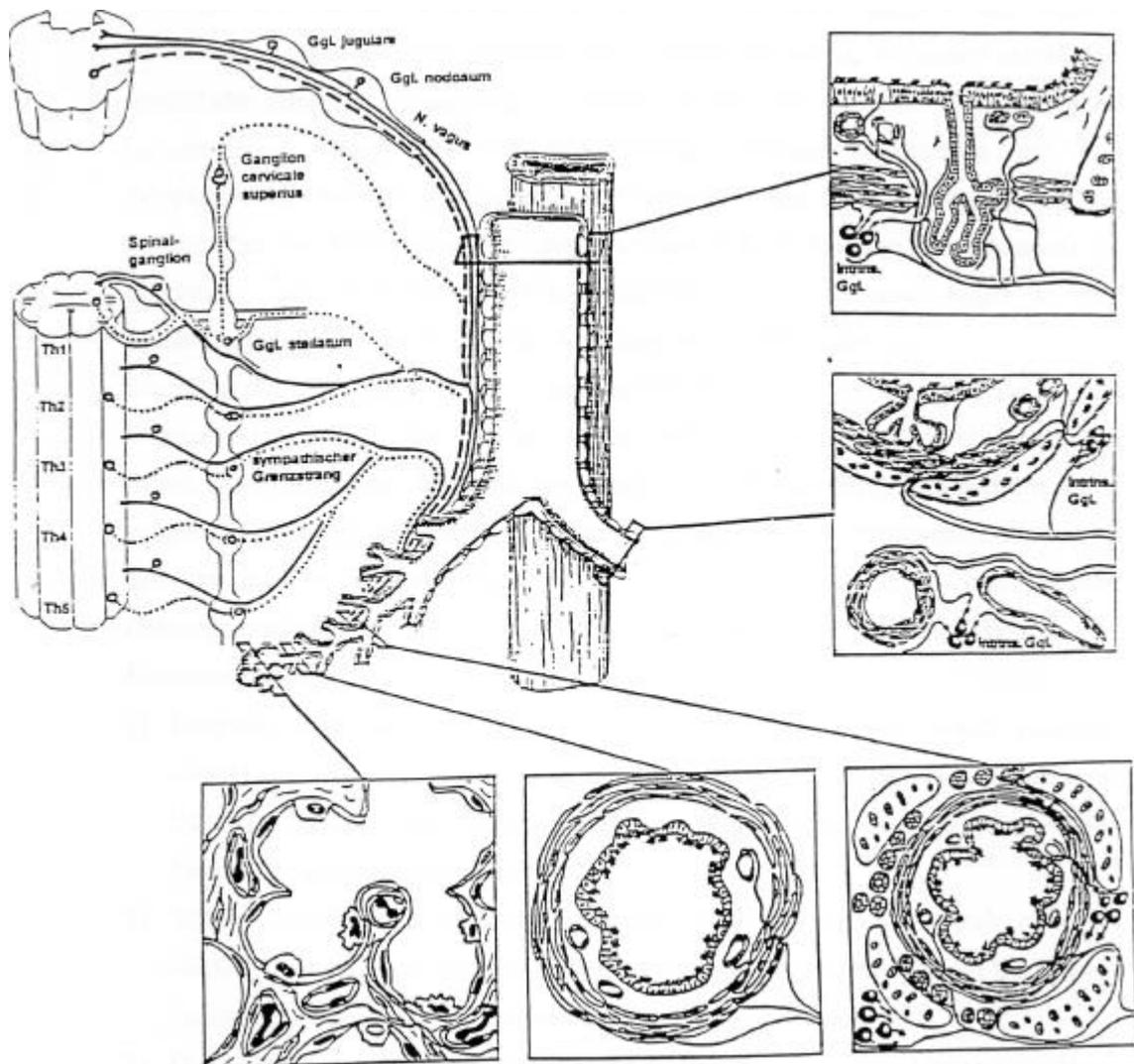
Speziesunterschiede auf. Bei den Meerschweinchen konnte ein dichtes Geflecht von sympathischen noradrenergen Nervenfasern gezeigt werden (Coburn et al. 1973). Noradrenerge sympathische Nervenfasern in den Atemwegen des Menschen sind um Gefäße und submuköse Drüsen (Partanen et al. 1982, Pack et al. 1984) und nur spärlich in der glatten Atemwegsmuskulatur lokalisiert (Partanen et al. 1982, Pack et al. 1984, Laitinen et al. 1985). Nicht-adrenerge sympathische Neurone, die das Stickstoffmonoxid synthetisierende Enzym, NO-Synthase (NOS), enthalten, ziehen beim Meerschweinchen ebenfalls zu den Atemwegen (Fischer et al. 1996b). NOS-positive Neurone in sympathischen Ganglien wurden beim Menschen (Fischer et al. 1993b) zahlreich nachgewiesen, so daß ein Teil der zahlreichen NOS-positiven Nervenfasern in den Atemwegen des Menschen (Fischer und Hoffmann 1996) wahrscheinlich auch sympathischer Herkunft ist.

1.1.2 Parasympathische Innervation

Präganglionär parasympathische Neurone liegen im Nucleus dorsalis nervi vagi und im Nucleus ambiguus. Diese entsenden ihre Axone als einen Teil des Nervus vagus zu den Neuronen in den Atemwegen gelegenen Ganglien (s.Abb.1 ; Kalia & Mesulam 1980). Von den intrinsischen, parasympathischen Ganglien ziehen kurze postganglionäre Nervenfasern zu den verschiedenen Zielgebieten der unteren Atemwege. Acetylcholin (ACh) als klassischer Mediator der prä- und postganglionären parasympathischen Neurone ist seit langem bekannt. Bei vielen Untersuchungen mit verschiedenen Säugerspezies konnte durch Nachweis des ACh-Abbauenzym Acetylcholinesterase ACh als Mediator in postganglionären parasympathischen Neuronen, die mit ihren Nervenendigungen die glatte Atemwegsmuskulatur und die exokrinen Drüsen innervieren, nachgewiesen werden (Mann 1971). Cholinerge Nervenendigungen um Blutgefäße und in der Lamina propria mucosae wurden mit immunhistochemischen Methoden zur Lokalisation des ACh-synthetisierenden Enzyms, Cholin Acetyltransferase (ChAT), beim Meerschweinchen gefunden (Canning und Fischer, 1997). Ebenso wurde über die Abwesenheit von cholinergen Nervenfasern in der Lamina propria mucosae und um Blutgefäße der Atemwege des Menschen berichtet (Partanen et al. 1982). Die Verteilung der cholinergen parasympathischen Nervenfasern und ihrer Mediatoren unterscheiden sich von Spezies zu Spezies (Maggi et al. 1995).

Neben dem bereits erwähnten klassischen Mediator Acetylcholin wurden in den intrinsischen parasympathischen Neuronen der Atemwege des Menschen weitere Mediatoren entdeckt, die unterschiedliche und teilweise entgegengesetzte pharmakologische Wirkungen besitzen. Zu diesen zählen VIP (Dey et al. 1981) und NO (de Rada et al. 1993), VIP, NOS und ChAT kommen sogar teilweise kolokalisiert vor (Fischer et al. 1996a). Bei den anderen Spezies konnten noch weitere Mediatoren wie Galanin (Cheung et al. 1985), Substanz P (Dey et al. 1988, Fontan et al. 2000a), Calcitonin Gene-Related Peptide (Nohr et al. 1995), und Opiode (Shimosegawa et al. 1990) nachgewiesen werden.

Die intrinsischen parasympathischen Neurone der Atemwege erhalten modifizierende Einflüsse von Neuronen unterschiedlicher Herkunft (Coburn 1987). Das Vorkommen von Axonkollateralen sensibler Nervenfasern (Kummer et al. 1992b, Lundberg et al. 1988) bis zu der Existenz von sympathischen Rezeptoren wie α 2-Rezeptoren in den intrinsischen Ganglien vom Meerschweinchen und Mensch (Anderson & Grundström 1987) wurde beschrieben.



sympathisch -----
 parasympathisch ——
 sensible ——

Abb.1 Übersicht über die Innervation der Atemwege (aus Fischer Allergologie, 1997)

1.1.3 Sensible Innervation

Der größte Teil der afferenten (=sensiblen) Nervenfasern der Atemwege verläuft mit dem Nervus vagus und endet mit der zentralen Projektion in den Nucleus des Tractus solitarius. Die Perikaryen dieser pseudounipolaren Neurone liegen in den vagalen sensiblen Ganglien (Ganglion jugulare und Ganglion nodosum). Außerdem wurde eine zusätzliche afferente Versorgung der Atemwege aus den thorakalen Spinalganglien nachgewiesen. Diese afferenten Nervenfasern verlaufen zusammen mit den sympathischen Axonen, durchqueren die sympathischen Grenzstrangganglien und ziehen über die Hinterwurzel zu den Laminae I & II (Substantia gelatinosa) im Hinterhorn des Rückenmarks. Die Zellkörper dieser Neurone liegen in den Spinalganglien (Kummer et al. 1992, Lundberg et al. 1988, s. Abb.1).

Die afferente Innervation der Atemwege erhält die Erregungen von Berührungs- und Dehnungsrezeptoren an der Trachea, den Bronchi und den Bronchioli, aber auch von denen unter der Pleura. Weiterhin ist bekannt, daß die sensiblen Nervenfasern durch exogene (Capsaicin) und endogene (Histamin, Bradykinin und Prostaglandine) Stimuli aktiviert werden können (Saria et al. 1988). Aufgrund dieser und weiterer elektrophysiologischer Eigenschaften lassen sich die sensiblen Nervenfasern in drei Klassen einteilen:

- 1) Langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren (Slowly adapting stretch receptors =SAR) sind hauptsächlich in der glatten Muskulatur der Trachea und des Bronchus lokalisiert. Durch ihre myelinisierten Axone erreichen sie eine relativ hohe Leitungsgeschwindigkeit (5,8 m/s).
- 2) Schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren (Rapidly adapting stretch receptors =RAR) befinden sich sowohl im respiratorischen Epithel als auch in der glatten Atemwegsmuskulatur. Ihre Axone sind ebenfalls myelinisiert.
- 3) Die C-Fasern sind in der Trachea, dem Bronchus und dem Lungenparenchym anzutreffen. Sie leiten aufgrund ihrer unmyelinisierten Axone sehr langsam (<1 m/s, Coleridge & Coleridge 1986)

Ergebnisse aus elektrophysiologischen Untersuchungen, der Immunhistochemie und der retrograden Tracing-Experimente zeigten, daß RAR und C-Fasern nicht nur elektrophysiologisch, sondern auch neuroanatomisch verschiedenen Populationen angehören (Ricco et al. 1996). Die Perikaryen der RAR des Meerschweinchens befinden sich im Ganglion nodosum, die der C-Fasern im Ganglion jugulare.

Die sensiblen Nervenfasern setzen an der Synapse der zentralen Projektion klassische erregende (exzitatorische) Transmitter wie Glutamat bzw. Aspartat frei (Dalsgaard 1988). Außerdem kann eine Freisetzung von weiteren Mediatoren durch adäquate Reizung oder durch antidrome Stimulation in den peripheren Nervenfasern bewirkt werden (Levine et al. 1985, Stretton 1991). Zu den am besten untersuchten Mediatoren der Atemwege zählt die Familie der Tachykinine zu denen die Neuropeptide Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA) gehören. Ein weiteres wichtiges Neuropeptid der sensiblen Nervenfasern ist Calcitonin Gene-Related Peptid (Kummer et al. 1992, Verastequi et al. 1997b). Diese Mediatoren üben je nach ihren pharmakologischen Eigenschaften eine lokale effektorische Funktion aus (Levine et al. 1993, Stretton 1991).

1.2 Mediatoren

Neben den bereits erwähnten klassischen Mediatoren Noradrenalin in postganglionären sympathischen, Acetylcholin in parasymphatischen Nervenfasern, existieren eine Reihe von Neuropeptiden, die ausgeprägte pharmakologische Effekte auf den Muskeltonus der Blutgefäße und der Bronchien, die Drüsensekretion und auf Entzündungs- und Immunzellen haben (Iwanmoto et al. 1993, Boichot et al. 1993, Lundberg et al. 1988). Diese Neuropeptide gehören zu keinem morphologischen eingrenzbaeren Nervensystem. Die Effekte, die diese Neuropeptide hervorrufen, werden unter dem Begriff des nicht-adrenergen nicht-cholineren (NANC)-System zusammengefaßt.

Aufgrund physiologischer und pharmakologischer Erkenntnisse können die NANC-Mediatoren in zwei funktionelle Gruppen eingeordnet werden (Widdicombe 1998). Die Tachykinine und CGRP einerseits gehören zum exitatorischen NANC-System (eNANC) (Lundberg et al. 1983, Karlsson et al. 1984), NOS, VIP und NPY andererseits zum inhibitorischen NANC-System (i-NANC) (Li et al. 1991, Lundberg et al. 1994). In den letzten Jahren erlangten die NANC-Mediatoren immer mehr Bedeutung, da sie möglicherweise an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt sind.

Tabelle 1 : Mediatoren

<u>Funktionelles System</u>	<u>Herkunft</u>	<u>klass.Transmitter</u>	<u>NANC-Mediatoren</u>
Trachea			
sympathisch	Ggl. .cervicale superius Ggl . stellatum	NA	NPY,VIP,NO Dynorphin
parasympathisch	lokale Ggll .	ACh	VIP,NO,Enkephalin
sensibel	Ggl. nodosum Ggl. jugulare Spinalggl.?	Aspartat Glutamat	SP,NKA,CGRP, NO, Dynorphin
Lunge			
sympathisch	Ggl. cervicale superius Ggl. stellatum Grenzstranggl. T3-T5	NA	NPY,VIP,NO Dynorphin
parasympathisch	lokale Ggll.	ACh	VIP,NO,Enkephalin*
sensibel	Ggl. nodosum Ggl. jugulare Spinalggl. C7-T6	Aspartat Glutamat	SP,NKA,CGRP, NO, Dynorphin

Einteilung der Atemwegsinnervation (nach Kummer et al. 1992, *=Shimosegawa et al. 1990)

1.2.1 Tachykinine

Der am längsten bekannte und am besten untersuchte Vertreter der Tachykinin-Familie ist Substanz P. Es wurde erstmal 1931 beschrieben (von Euler and Gaddum), aber erst 1971 sequenziert (Chang et al. 1971). Bei den Tachykininen handelt es sich um eine Familie von Neuropeptiden, die alle an ihrem C-terminalen Ende die gleiche Aminosäuresequenz (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, X steht für eine variable Aminosäure) aufweisen. Die in den Atemwegen neben Substanz P vorkommenden Tachykinine sind Neurokinin A (NKA)(Kangawa et al. 1983), sowie dessen N-terminal verlängerte Peptide Neuropeptid K (NPK) (Tatemoto et al.1985), Neuropeptid γ (Kage et al. 1988, (Harmar et al. 1990). Diese Peptide werden vom gleichen Gen, dem Präprotachykinin A (PPT-A)-Gen kodiert (Nawa et al. 1983). Aus dem Präprotachykinin A-Gen wird mRNA transkribiert und alternativ gespleißt, so daß 4 mRNA-Formen ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) entstehen können (Nawa et al. 1983). Allen vier ist gemeinsam, daß die entsprechenden Prä-pro-Peptide die Sequenz von Substanz P(SP) enthalten. Neurokinin A (NKA) und seine N-terminal verlängerten Formen, Neuropeptid K und Neuropeptid γ entstehen nur in solchen Zellen, die von diesem Gen die β -(Neuropeptid K) oder γ -Form der mRNA (Neuropeptid γ) spleißen (s.Abb.2). Ein weiterer Vertreter der Tachykinine ist das in den Atemwegen bisher nicht nachgewiesene Neurokinin B (NKB). Es wird vom PPT-B-Gen kodiert (Kotani et al. 1986).

Die Tachykinine (Substanz P, Neurokinin A und Neuropeptid K) wurden in den Nervenfasern der unteren Atemwege des Meerschweinchens und des Menschen mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen (Hua et al. 1985 , Lundberg et al. 1984). Heute ist bekannt, daß jedes Kompartiment der unteren Atemwege mit Ausnahme der Knorpelspannen von tachykinin-haltigen Axonen durchzogen wird. Diese Nervenfasern enthalten neben den Tachykininen auch Immunreaktivität gegen das Calcitonin Gen-verwandte Peptid (CGRP). Durch den kombinierten Einsatz der retrograden neuronalen Markierung und der Immunhistochemie konnten die sensiblen Vagusganglien (insbesondere das Ganglion jugulare) und die oberen thorakalen Spinalganglien als die Ursprungsstätten SP/NKA/CGRP-immunreaktiver Nerven der Lunge beim Meerschweinchen identifiziert werden (Kummer et al. 1992). Diese Nervenfasern sind in der Lamina propria, in der glatten Muskulatur der Atemwege und

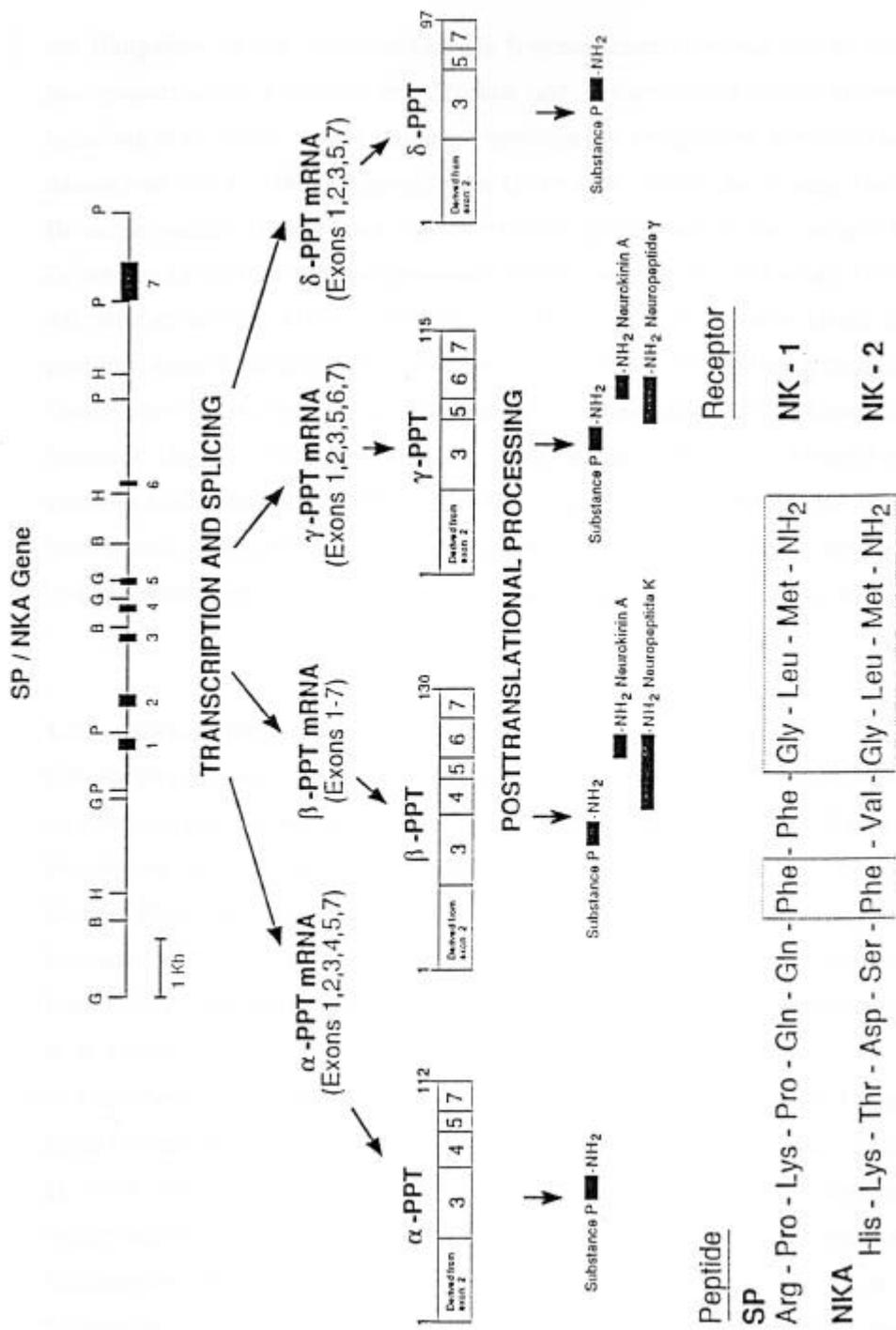


Abb.2 Schema der Synthese der vom Prä-Pro-Tachykinin-A-Gen kodierten Tachykinine

der Blutgefäße in den Randbezirken des lymphatischen Gewebes und in den kleinen parasymphatischen Ganglien der Trachea und Bronchien lokalisiert (Übersicht bei Lundberg et al. 1988). Ihre Wirkungen vermitteln die Tachykinine über die Tachykinin-Rezeptoren (NK1-, NK2-Rezeptor)(siehe Helke et al. 1990), die in dem Trachea- und Bronchialmuskel, Drüsen- und respiratorischen Epithel und in den einzeln liegenden Zellen der Lamina propria nachgewiesen werden konnten (Fischer et al. 1992). Durch die unterschiedliche Affinität der Tachykinine zu ihren Rezeptoren lassen diese sich pharmakologisch differenzieren. Substanz P vermittelt ihre Wirkung bevorzugt über Tachykinin-NK1-Rezeptor und Neurokinin A bevorzugt über Tachykinin-NK2-Rezeptor. Der NK3-Rezeptor, der in den intrinsischen Ganglien des Meerschweinchens vorkommt (Canning et al. 1997) bindet bevorzugt das Neurokinin B, das in der Lunge bislang nicht nachgewiesen wurde. Insgesamt können die Wirkungen der Tachykinine in den Atemwegen als proinflammatorisch bezeichnet werden (Joos et al. 2000a).

1.2.2 Stickstoffmonoxid

Erst vor einigen Jahren wurde das Gas Stickstoffmonoxid (NO) als ein Neuromediator im zentralen und peripheren Nervensystem entdeckt (Bredt et al. 1990). Zuvor war die Beteiligung von NO an der Regulation des Gefäßtonus als EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor) und der zellulären Immunabwehr bekannt. NO wird bei der Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin von drei verschiedenen Isoformen des Enzyms NO-Synthase in einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen produziert (Moncada et al. 1989).

NO-Synthase Typ I (neuronal NO-Synthase = nNOS, auf Chromosom 17) wird vor allem in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems gefunden (Springall et al. 1992 und Vincent & Hope 1992). Neuronale NOS wurde in Mastzellen der menschlichen Nasenschleimhaut (Bacci et al. 1994) und in spezialisierten Epithelzellen der Macula densa der Niere nachgewiesen (Mundel et al. 1992). Neuronale NOS spielt im Gehirn bei so komplexen Prozessen wie Lernen und Gedächtnis eine wichtige Rolle und ist beteiligt an etlichen Formen der neuronalen Plastizität. Das läßt sich ableiten aus Befunden, nach denen NOS-Inhibitor oder die Mutation der nNOS-Gene bei Mäusen zu einer Blockierung oder Reduzierung der sogenannten "Long Term Potentiation" (LTP) führt (O'Dell et al. 1994, Son et al.

1996). Neuronale NOS und das seit 30 Jahren bekannte Enzym NADPH-Diaphorase sind identisch (Dawson et al. 1991, Hope et al. 1991).

NO-Synthase Typ II (induzierbare NO-Synthase = iNOS, auf Chromosom 12) wird in Makrophagen, Hepatozyten der Maus (Morikawa et al. 1999) und in der Retina der Ratte gefunden (Lopez-Costa et al. 1997) und kann durch Zytokine (IFN-gamma, Interleukin-1, -2), Lipopolysacharide (Dawson et al. 1994), Tumor Nekrose Faktor (TNF-alpha) u.a. stimuliert werden. Da iNOS oft in Entzündungs- und Immunzellen, aber auch in den Epithelzellen der Atemwege des Menschen, der Ratte und der Maus zu finden ist (Robbins et al. 1994a, 94b, Guo et al. 2000) und durch Zytokine stimuliert wird, wird eine Beteiligung von iNOS am inflammatorischen Geschehen diskutiert (Kobzik et al. 1993).

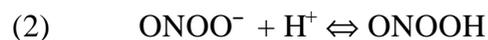
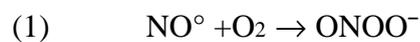
NO-Synthase Typ III (endotheliale NO-Synthase = eNOS, auf Chromosom 7) synthetisiert in den Endothelzellen NO, das an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt ist (Stauss et al. 1999) und außerdem die Thrombozytenaggregation und -adhäsion an der Gefäßwand hemmt (Freedman et al. 1999). Eine Beteiligung des von den Endothelzellen der Atemwege synthetisierten NO an der physiologischen Regulation der Atemwege beim Menschen wurde beschrieben (Kobzik et al. 1993).

Durch die Entwicklung von Antikörpern gegen gereinigte NOS und die Identität von nNOS und neuronaler NADPH-Diaphorase ist es möglich geworden, mit histochemischen und immunhistochemischen Methoden NOS im Nervensystem zu lokalisieren. Neuronale NOS-positive Nervenfasern in den unteren Atemwegen beim Meerschweinchen (Fischer et al. 1993), Frettchen (Dey et al. 1993) und Menschen (Diaz et al. 1993, Kobzik et al. 1993, Fischer und Hoffmann, 1996) wurden gefunden. Die Herkunft dieser Nervenfasern konnte durch retrograde neuronale Markierung in sensiblen Vagusganglien (Ganglion jugulare und nodosum) des Meerschweinchens identifiziert werden. Einige retrograd markierte Neurone der sympathischen Ganglien (Ganglion cervicale superius und stellatum) zeigten auch nNOS-Immunreaktivität (Fischer et al. 1996b). Weiter konnten nNOS-immunreaktive Neurone in den intrinsischen trachealen und bronchealen Ganglien des Menschen nachgewiesen werden (Fischer und Hoffmann, 1996).

Die Wirkung von NO auf die Effektorzelle führt zur Aktivierung der Guanylatcyclase in glatten Muskelzellen (Ignarro et al. 1992, Rand et al. 1992) und so in der Zielzelle zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels (Rapoport et al. 1983). In vitro sowie auch in

vivo Studien und Studien mit elektrischer Feldstimulation (EFS) zeigten eine NO-induzierte cGMP-abhängige Relaxation der menschlichen glatten Trachealmuskulatur. NO wurde als der von den i-NANC-Nervenfasern freigesetzte Mediator, der die aktive Relaxation auslöst, aufgefaßt (Belvisi et al. 1993, Li et al. 1991, Tucker et al. 1990, Ward et al. 1995). Seit langem nimmt man an, daß inhibitorische nonadrenerge noncholinerge (iNANC) Mediatoren, darunter NO, dazu beiträgt, eine exzessive Bronchokonstriktion bei verschiedenen Säugern, inklusive beim Menschen, zu verhindern (Belvisi et al. 1992, Di Maria et al. 2000, Ward et al. 1993).

Im Gegensatz zu den meisten Neuromediatoren, die in Vesikeln gespeichert und bei Stimulation durch Exozytose freigesetzt werden, wird NO bei Bedarf erst synthetisiert. Neben den erwähnten Wirkungen verursacht NO als radikales Molekül (reaktive Stickstoff Spezies = RNS) auch schädigende Effekte. Aus NO können Stickstoffoxide wie Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) entstehen. NO kann aber auch in einer biochemischen Reaktion (Beckman et al. 1990) mit Peroxiden zu Peroxynitrit (ONOO^- , 1.Reaktion) reagieren (Huie und Padmaja 1993). Die Halbwertszeit von ONOO^- bei 37°C und ein pH von 7,4 liegt bei etwa 1 Sekunde. In wässriger Lösung bildet sich aus ONOO^- Peroxynitrosäure (ONOOH , 2. Reaktion).



Stickstoffoxide sind sehr reaktionsfreudig und reagieren mit Sauerstoff, Sauerstoffperoxiden, Wasser, Proteinen, Aminen, Nukleotiden und Lipiden. Die dabei entstandenen Reaktionsprodukte haben folgende Wirkungen: Bronchodilatation, Erhöhung der pulmonalen Gefäßpermeabilität (Peroxynitrit) sowie mutagenes Potential (Nitrosamin).

1.2.3 Noradrenalin

Noradrenalin (NA) ist der klassische Transmitter der postganglionären sympathischen Nervenfasern in den unteren Atemwegen bei Säugern, einschließlich des Menschen. Das Substrat der Biosynthese des Noradrenalins und Adrenalins ist Tyrosin, das durch das Schrittmacherenzym Tyrosin-Hydroxylase in Dihydroxyphenylalanin (Dopa) und weiter in Dopamin umgewandelt wird. Durch Hydroxylierung des β -Kohlenstoffes der Seitenkette vom Dopamin mit Hilfe des Enzyms Dopamin- β -Hydroxylase entsteht Noradrenalin. In einem weiteren biochemischen Reaktionsschritt entsteht durch die Methylierung des Noradrenalins Adrenalin. Diese Katecholamine werden in den Zellen des Nebennierenmarks und des sympathischen Nervensystems in Sekretgranula gespeichert.

In immunhistochemischen Studien wurde das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH) in Nervenfasern um die Gefäße und in der glatten Muskulatur der Trachea und der Bronchien der unteren Atemwege gefunden. Diese Nervenfasern enthalten oft zusätzlich Neuropeptid Tyrosin (NPY) (Lundberg et al. 1983, 88, Uddman et al. 1984). Durch die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen das Schrittmacherenzym TH, das als Marker zur immunhistochemischen Darstellung catecholaminhaltiger Nervenfasern und Neurone verwendet wird, konnten in Rahmen von Tracingsstudien TH- und NPY-Immunreaktivität in den Perikaryen der sympathischen Ganglien (des Ganglion stellatum und des Ganglion cervicale superius) und damit auch die Herkunft der sympathischen efferenten Nervenfasern der unteren Atemwege des Meerschweinchens nachgewiesen werden (Kummer et al. 1992b). TH-positive Neurone mit Projektion zum Ösophagus und Magen wurden auch in den Vagusganglien der Ratte gezeigt (Kummer et al. 1992a). TH-immunreaktive Neurone wurden ebenfalls in den parasympathischen (intrinsischen) Ganglien des Meerschweinchens beobachtet (Kummer et al. 1992b).

Eine Beteiligung der noradrenergen sympathischen Nervenfasern an der Atemwegsrelaxation konnten in vielen Untersuchungen gezeigt werden (Coburn und Tomita 1973). NA vermittelt vorwiegend über β 2-Rezeptoren durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase eine Bronchodilatation, eine Sekretionssteigerung sowie eine Steigerung der Zilien-Schlagfrequenz beim Menschen. Bei Katzen und Frettchen dagegen wird die Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur hauptsächlich über β 1-Rezeptoren vermittelt (Lulich et al. 1976, Skoogh et al. 1985). Durch Stimulation der

α -Rezeptoren kommt es zu einer Kontraktion der tracheobronchialen glatten Muskulatur bei verschiedenen Spezies, einschließlich beim Menschen (Kneussl et al.1978).

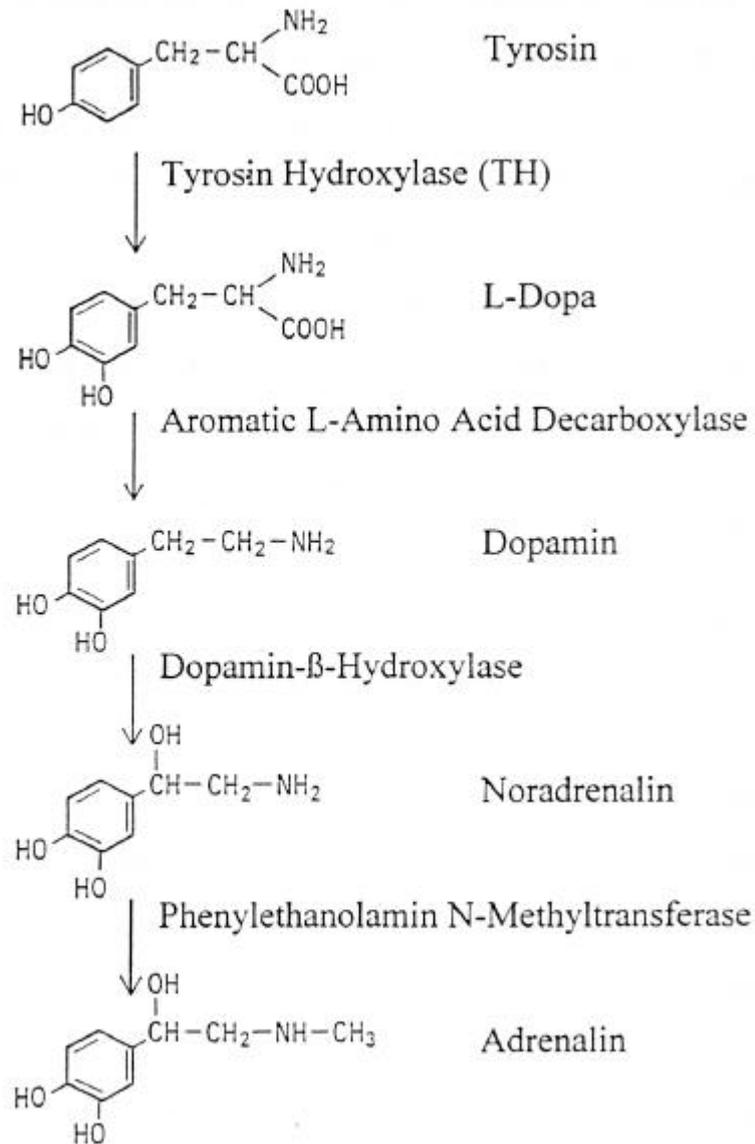


Abb. 3 Katecholamin Biosynthese Weg

1.2.4 Neuropeptid Tyrosin

Neuropeptid Tyrosin (NPY) ist ein aus 36 Aminosäuren aufgebautes Peptid, das aus Gehirn-Extrakten des Schweins zum ersten Mal isoliert wurde (Tatemoto et al. 1982). Es gehört zusammen mit Peptid YY zu der großen Familie der pankreatischen Polypeptide. Beide besitzen sowohl am C- als auch am N-terminalen Ende Tyrosin-Reste in Position 1 und 36. Außerdem erhält NPY weitere Tyrosin-Reste an den Positionen 20, 21 und 27 des Moleküls.

NPY wird in hohen Konzentrationen im Gehirn gefunden, während Peptid YY vorwiegend im Gastrointestinal-Trakt nachgewiesen wird. Nach der Entwicklung spezifischer Antikörper gegen NPY konnte in zahlreichen immunocytochemischen Studien spezifische NPY-Immunreaktivität in Nerven peripherer Gewebe der Maus (Allen et al. 1982), des Meerschweinchens (Furness et al. 1983), im Gehirn des Menschen (Adrian et al. 1983), im Gehirn von Ratten und Affen (Köhler et al. 1986) und im Rückenmark von verschiedenen Säugern, einschließlich des Menschen lokalisiert werden (Allen et al. 1984, Dawbarn et al. 1984, Chan-Palay et al. 1985).

In der Peripherie konnten Nervenfasern mit NPY-Immunreaktivität im gesamten Respirationstrakt der Katze, des Meerschweinchens, der Ratte (Uddman et al. 1984), der Maus (Verastegui et al. 1997) und des Menschen (Lundberg et al. 1982) nachgewiesen werden. Diese Nervenfasern finden sich reichlich um die Blutgefäße, die seromukösen Drüsen, in der Tunica mucosa und in der glatten Muskulatur der tracheobronchialen Wand. Kolokalisationen von TH und NPY in den zur Lunge ziehenden Nervenfasern wurden oft gefunden. Ein adrenerger Ursprung der NPY-positiven Nervenfasern wurde daher angenommen (Kummer et al. 1992b). Durch retrograde neuronale Markierung kombiniert mit Doppelimmunhistochemie am Meerschweinchen konnten zum ersten Mal eine große Anzahl von sympathischen Ganglienzellen (SCG und Stellatum) mit NPY- und TH-Immunreaktivität, die die unteren Atemwege innervieren, gezeigt werden (Kummer et al. 1992b). Nur eine kleine Zellpopulation mit Projektion zu den unteren Atemwegen enthält NPY-Immunreaktivität, aber keine TH-Immunreaktivität.

Die unterschiedliche biologische Aktivitäten von NPY und Peptid YY werden über NPY-Rezeptoren vermittelt. Die Effekte von NPY im Zentralnervensystem liegen wahrscheinlich in der Regulation des Blutdrucks und der Nahrungsaufnahme (Bing et al. 1999). Weitere Studien wiesen auf eine Interaktion von NPY und Noradrenalin hin. Die Infusion von NPY und Noradrenalin verursachte eine vaskuläre Reaktion wie bei

der sympathischen Stimulation (Lundberg et al. 1982). Als i-NANC-Mediator relaxiert NPY die glatte Atemwegsmuskulatur, führt aber zu einer Vasokonstriktion der Blutgefäße der Atemwege (Lundberg et al. 1994). Weitere Funktionen der NPY-positiven Nervenfasern liegen in der Regulation der Drüsensekretion. NPY inhibiert die cholinerge und tachykinerge Bronchokonstriktion (Matran et al. 1989, Stretton et al. 1990). Im Gegensatz zum Meerschweinchen und zu anderen Spezies ist die sympathische Innervation der unteren Atemwege der Maus vergleichsweise wenig untersucht.

1.3 Ziele und Fragestellungen

Die Maus wurde in den letzten Jahren immer wieder als Allergie-Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie der Atemwegserkrankungen verwendet. Tiermodelle haben die Kenntnisse über die Pathomechanismen, insbesondere bei entzündlichen Atemwegserkrankungen, bereichert. Rasche Fortschritte in der Erstellung von Genom-Dateien der Maus und in der Herstellung von "knockout"-Mäusen führen dazu, daß Informationen und Techniken für genetische Studien mit der Maus in kurzer Zeit expandiert und leicht erhältlich sind. Diese Tatsachen stellen einen klaren Vorteil für ein Studium von Erkrankungen im Mausmodell dar.

Die Vorteile der Mausmodelle liegen außerdem in der Zugänglichkeit der Untersuchung von immunologischen Veränderungen. Die grundsätzliche Bedeutung der einzelnen Zellen des Immunsystems bei der Allergieaufnahme, -präsentation (dendritische Zellen und Makrophagen) sowie der Regulation der Immunantwort (T-Zellen) über Effektorzellen (B-Zellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten) im Rahmen der allergischen Entzündungsreaktion ist unbestritten (Boichot et al. 1993, Iwamoto et al. 1993, Lipscomb et al. 1999). Es ist auch bekannt, daß die Epithel- und Immunzellen mit den Nervenfasern eine funktionelle Einheit bilden und deren Schädigung entscheidend zur Pathophysiologie des allergischen Asthma beiträgt (Goto et al. 2000). Diese Tatsachen stellen einen klaren Vorteil für ein Studium von Erkrankungen im Mausmodell dar.

Insgesamt ist der Wissenstand über die Verteilung der neuropeptid-immunreaktiven Nervenfasern in den unteren Atemwegen beim Meerschweinchen und bei anderen Spezies wie bei der Ratte, der Katze, der Maus (Uddman et al. 1984) und beim

Menschen (Lundberg et al. 1988) relativ gut. Aber nur einige Studien versuchten den Ursprung dieser in den unteren Atemwegen lokalisierten Nervenfasern zu bestimmen. Der Wissenstand über die Herkunft und die Verteilung der Nervenfasern mit ihren Neuropeptiden, die die unteren Atemwege innervieren, muß bei der Maus im Gegensatz zum Meerschweinchen (Kummer et al. 1992b) vergleichsweise als gering angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit soll mittels retrograder neuronaler Markierungen der vagal-sensible und sympathische Ursprung der zu den unteren Atemwegen projizierenden Nervenfasern der Maus bestimmt werden. Das Ziel ist auch, eine quantitative Analyse der Kollokationen von NOS-/SP-positiven Neuronen in sensiblen Vagusganglien und von TH-/NPY-positiven sympathischen Ganglienzellen, die die unteren Atemwege der Maus versorgen, durchzuführen. Die Muster von der Co-existenz der Neuropeptide in den Perikarya sowie Nervenfasern vereinfachen unser Verständnis über die Organisationsstruktur der Atemwegsinnervation. Weiter sollen durch Korrelationsuntersuchungen der Neuropeptide (SP/NOS und TH/NPY) die mögliche Herkunft der in der Lungen identifizierten Nervenfasern nachgewiesen werden. Diese Daten sind wichtig für das Verständnis des Asthma bronchiale und sind für die weiteren vergleichenden Untersuchungen an der transgenen Maus als Allergie-Modell unverzichtbar.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die Studien wurden insgesamt 10 ausgewachsene FVB-Mäuse beiderlei Geschlechts (Charles River Laboratories) mit einem Gewicht zwischen 15-20g verwendet. Nur Tiere ohne klinische Anzeichen von Erkrankungen wurden für diese Studie ausgewählt.

2.2 Retrograde neuronale Markierung

Die FVB-Mäuse wurden durch eine intramuskuläre Injektion mit Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke Davis, Freiburg, BRD; 50mg/kg Körpergewicht) in den Oberschenkel betäubt und analgetisiert. Nach einem 5-minütigen Intervall folgte jeweils eine weitere intramuskuläre Injektion an der kontralateralen Seite mit Dihydro-Thiazin-Hydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen, BRD; 50mg/kg Körpergewicht), die zu einer zusätzlichen Analgesie führte und eine Relaxation der Tiere bewirkte. Die Trachea wurde mit einem medianen, zervikalen Längsschnitt ventral freigelegt und durch einen kleinen Schnitt zwischen zwei benachbarten Knorpelspannen eröffnet. Die Kanüle der 10- μ l Mikropipette Syringe (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurde durch den ventralen Schlitz bis in den rechten Hauptbronchus eingeführt und 5 μ l Fast Blue (2% wässrige Lösung enthält 1% DMSO, Dr. K Illing, Groß Umstadt, BRD) injiziert. Die Tracheainzision wurde mit einer 7-0 Vicryl Naht (Ethicon, Norderstedt, BRD) und der Hautschnitt mit einer 4-0 Vicryl-Naht (Ethicon) zugenäht. Die operierten Tiere wurden unter einer UV-Lampe bis zum Aufwachen vor Unterkühlung geschützt. Die Tiere erholten sich 2 Stunden nach der Operation und begannen sofort zu fressen. Alle Tiere konnten sich ungestört erholen bis sie nach 7 Tagen ausgewertet wurden.

2.3 Gewebe

Den operierten Tieren wurden nach Tötung durch CO₂-Intoxikation die Lungen mit der Trachea (als Thoraxpaket), das Ganglion cervicale superius (beidseits), das Ganglion stellatum (beidseits) und die Ganglien jugulare/nodosum (als Komplex, beidseits) entnommen .

2.3.1 Gewebeparbeitung

Die durch die Eröffnung des Thorax kollabierten Lungen wurden zur Optimierung der Fixierung und Erleichterung der späteren Bearbeitung intraluminal mit Zamboni-Lösung (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (PP), pH 7,4) durch die Trachea perfundiert. Alle Gewebeprobe wurden in Zamboni-Lösung für ca. 24 Stunden, abhängig von der Gewebeprobengröße, immersionsfixiert. Nach mehrmaligem Spülen mit 0,1 M PP, pH 7,4, wurde das Gewebe in einem 18% saccharosehaltigen 0,1 M PP für ca. 24 Stunden zur Kryoprotektion überführt. Für die weitere Bearbeitung wurde das Gewebe mit OTC (Miles Inc, Elkhart, IN, USA) auf Filterpapier aufgebracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 C aufbewahrt. Von den gefrorenen Ganglien wurden bei -25C in einem Kryostaten (Frigocut E, Fa. Reichert, Nussloch, BRD) 8 µm dicke Serienschnitte (Lungegewebe, 12µm dick) angefertigt und auf Chromalaun/Gelatine beschichtete Objektträger aufgenommen. Die Schnitte wurden danach bei Dunkelheit für 30 Minuten luftgetrocknet und bei -20C aufbewahrt.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Doppelimmunfluoreszenz

Das mit Tracer markierte Gewebe mußte bei der Bearbeitung vor Lichteinfall geschützt werden. Alle Schnitte wurden vor der Weiterverarbeitung mit immunhistochemischen Methoden eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit einer Blocklösung aus 10% normalem Schweineserum, 0,5% Tween, 0,1% Rinderserumalbumin in Phosphatpuffer (PBS) mit 1,8%igem Salzgehalt für eine Stunde vorinkubiert. Nach zweimaligem Spülen in PBS wurden die Primärantikörper gegen NOS/SP bei den sensiblen Vagusganglien (Ganglion jugulare/nodosum, Lunge) und TH/NPY bei den sympathischen Ganglien (Ganglion cervicale superius, Ganglion stellatum, Lunge) in ihren entsprechenden Verdünnungen aufgetragen (siehe Tabelle 1). Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion des Primärantikörpers wurden nach zweimaligem Spülen (2x 10 Minuten) in PBS die entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde aufgetragen: Für NOS-Antiserum wurde ein Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum von der Ziege, für SP-Antiserum ein biotinyliertes Anti-Ratten-IgG vom Schaf oder ein Cy-

TM-3-konjugiertes Anti-Ratten-IgG vom Esel aufgetragen. Der TH-Antikörper wurde mit einem FITC-gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG aus dem Schaf erfaßt. Der NPY-Antikörper wurde durch ein biotinyliertes gekoppeltes Anti-Schaf/Ziegen-IgG dargestellt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte mit Streptavidin Texas Rot zur Markierung des biotinylierten Antikörpers für eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurden die Schnitte noch einmal gewaschen und in gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckt.

Tabelle:1 Antikörper und Immunreagenzien

Primärer Antikörper	Verdünnung	sekundärer Antikörper	Verdünnung
polyklonales Anti-NOS-Antiserum, Kaninchen (Dr.B. Mayer, Graz, Österreich)	1:1000	FITC-gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, Ziege (Cappel, Ohio, USA)	1:400
monoklonaler Anti-SP-Antikörper, Ratte (Boehringer Ingelheim Heideberg, BRD)	1:400	biotinyliertes Anti-Ratten-IgG, Schaf (Amersham)	1:100
		Streptavidin Texas Rot (Amersham)	1:200
		oder	
		Cy-TM-3-konjugiertes Anti-Ratten-IgG vom Esel (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA)	1:50
polyklonales Anti-TH-Antiserum, Kaninchen (ETI, Code-Nr. 1012, Allendale, NJ, USA)	1:800	FITC-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG, Ziege (Cappel, Ohio, USA)	1:400
polyklonales Anti-NPY-Antiserum, Schaf (Dr.Blessing, Australien)	1:1000	biotinyliertes Anti-Schaf/Ziege-IgG, Esel, (Amersham)	1:400
		+ Streptavidin Texas Rot (Amersham)	1:200

Zur Auswertung diene ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskope (Olympus BX 60, Olympus optical co.GmbH, Hamburg, BRD) mit folgenden Filtern :

Tabelle:3	Filter für die Auflichtfluoreszenz
Fast Blue :	Filterkombination : BP 360-370 nm/BA 420-460nm oder Filterkombination : BP 470-490 nm/BA 515-550 nm
FITC :	Filterkombination : BP 520-560 nm/BP450-492 nm
Texas Rot :	Filterkombination : BP 545/580 nm /BA 610 nm
Cy3	Filterkombination : BP 525-560 nm /BA 570-650 nm

Nachdem das komplette Ganglion in Serienschnitten angefertigt und luftgetrocknet wurde, wurden die einzelnen Schnitte direkt unter dem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich Tracer markierter Neurone untersucht. Unter dem UV-Filter und mit einem 10x-Objektiv konnten die mit Fast Blue markierten Neurone identifiziert werden. Beide Filter ermöglichen die mit Fast Blue angereicherten Neurone sichtbar zu machen. Jeder zweite Objektträger des Ganglions (= jeden zweiten Schnitt des Ganglions), auf dem retrograde markierte Neurone sich befanden, wurde für die Doppelimmunfluoreszenz verwendet. Die Auszählung der retrograden markierten Neurone erfolgte nach der Immunhistochemie. Für FITC, Texas Rot und Cy3 wurden die oben (siehe Tabelle: 2) genannten Filterkombination verwendet.

Zur Auswertung und Dokumentation wurden für Schwarz/Weiß-Aufnahmen Kodak TMY 400 Filme und für Farbaufnahmen Kodak Ektachrom 64T Filme verwendet .

2.4.2 Kontrollen

NOS: Das Primärantiserum des Kaninchens wurde durch ein Serum eines nicht immunisierten Kaninchens oder durch PBS ersetzt. Außerdem erfolgte eine Präabsorption des polyklonalen NOS-Antiserums über Nacht bei 4°C mit NOS-Protein aus dem Kleinhirn des Schweins (Konzentration: 20 µg Antigen/ml Antiserum, B. Mayer, Graz, Österreich). Die Kontrollen wurden bei weiteren Schritten wie oben weiterbehandelt.

SP: Das Primärserum der Ratte wurde mit synthetischem SP (Konzentration wie oben) über Nacht bei 4°C präabsorbiert.

TH: Das Primärserum des Kaninchens wurde durch ein Serum eines nicht immunisierten Kaninchens ersetzt.

NPY: Das Primärserum des Schafes wurde mit synthetischem NPY (Konzentration wie oben) über Nacht bei 4°C präabsorbiert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Lokalisation retrograd markierter Neurone

3.1.1 Injektionsstellen

In dem rechten Hauptbronchus, in den der Tracer injiziert wurde, war nach der Tötung der Tiere immer noch fluoreszierender Tracer vorhanden. Bei einigen Tieren war der Tracer auch im linken Hauptbronchus zu sehen. Der untere luminale Anteil der Trachea wurde bei fast allen Tieren mit einer dünnen Farbstoff-Schicht bedeckt. Im lockeren Bindegewebe (die Tunica adventitia) sowie in den anderen Schichten der Speiseröhre wurde kein Farbstoff angereichert. Akkumulation von Farbstoff (Fast Blue) bis in den Segmentbronchien war zu sehen. Der Tracer verteilte sich über das gesamte Lungenparenchym bis zur Pleura visceralis (siehe Abb. 5).

3.1.2 Sensible Ganglien

Die sensiblen Vagusganglien (Ganglion jugulare und Ganglion nodosum) wurden zusammen als ein Komplex ausgewertet. Es konnte daher keine getrennte Aussage über die Anzahl der markierten Neurone in den Ganglien jugulare einerseits und in den Ganglien nodosum andererseits gemacht werden. Die Anzahl der retrograden markierten Ganglienzellen in den sensiblen Vagusganglien sind in der Tabelle 4 aufgelistet. Die Anzahl der retrograden markierten Neurone in den Vagusganglien auf der rechten Seite war höher als auf der linken Seite (55% zu 45%).

Tabelle 4: Anzahl von retrograden markierten Neuronen in sensiblen Vagusganglien

	Nr.1		Nr.2		Nr.3		Nr.4		Nr.5		Nr.6		x
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Ganglion jugulare/ Ganglion nodosum,re.	122	50	1070	81	1419	51	1086	51	651	47	844	47	55
Ganglion jugulare/ Ganglion nodosum,li.	121	50	252	19	1390	49	1053	49	721	53	947	53	45
Σ	243	100	1322	100	2809	100	2139	100	1372	100	1791	100	100

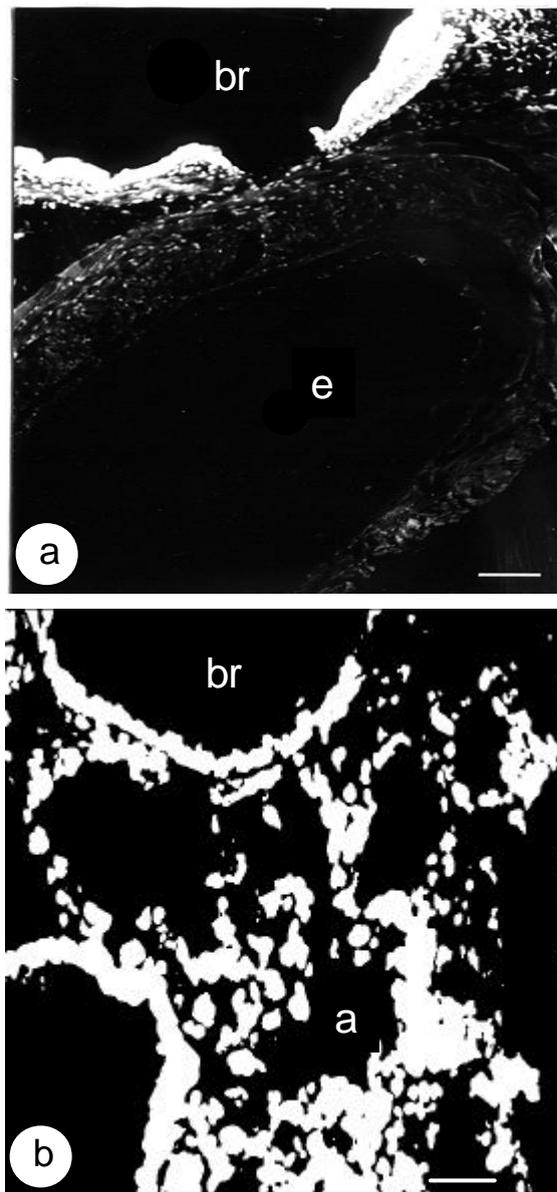


Abb.5 Injektionsstellen

Das obere Bild zeigt der Hauptbronchus (Br) mit der benachbarten Speiseröhre (O). Die Bronchuswand ist mit Fast blue angereichert. Die Ösophaguswand ist frei von dem Farbstoff. Eine diffuse Verteilung von Fast blue ist in dem Lungengewebe erkennbar. Das Epithel (E) der Bronchiolen (Br) sowie die Alveolarsepten sind mit Fast blue markiert. Alveole = (A). Balken = 50µm.

3.1.3 Sympathische Ganglien

In SCG wurden mehr retrograd-markierte Neurone als in Ganglien stellate gefunden (69% zu 31%). Zu ähnlichen Ergebnissen wie bei den sensiblen Vagusganglien wurden markierte Neurone in den sympathischen Ganglien verstärkt auf der rechten Seite gefunden (re. 54% zu li. 46%). Einzelheiten über die Anzahl der retrograd-detektierten Neurone in sympathischen Ganglien wurde in der Tabelle 5 dargestellt

Tabelle 5: Anzahl von retrograden markierten Neuronen in sympathischen Ganglien

	Nr.1		Nr.2		Nr.3		Nr.4		Nr.5		Nr.6		x
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	%
Ggl. cervicale sup, re	137	57	68	17	1720	42	2298	40	3437	37	1313	29	37
Ggl. cervicale sup, li	65	27	120	30	1493	36	1819	31	1741	19	1623	35	30
Ggl. stellatum ,re	35	14	132	33	531	13	808	14	1256	14	797	17	17
Ggl. stellatum ,li	4	2	77	20	392	9	872	15	2840	30	859	19	16
Σ	241	100	397	100	4136	100	5797	100	9274	100	4592	100	100

3.2 Immunhistochemie von retrograden markierten Neuronen

3.2.1 Sensible Ganglien

Die durch retrogrades neuronales Tracing markierten Neurone in den vagalen Ganglien wurden mit Doppelimmunhistochemie auf NOS-und/oder SP-Immunreaktivität untersucht. Auch hier konnte keine getrennte Aussage bezüglich der Ganglien jugulare und der Ganglien nodosum gemacht werden, da beide Ganglien als Komplex in Serien geschnitten und immunhistochemisch aufgearbeitet wurden. Alle möglichen Kombinationen der markierten Neurone mit NOS- und /oder SP-Immunreaktivität wurden beobachtet : FB/NOS-/SP-, FB/NOS+/SP-, FB/NOS+/SP+ und FB/NOS-/SP+ (siehe Tab. 5 und Abb.6a, 6b). Von den mit Fast Blue markierten Neuronen in den

vagalen Ganglien enthielten 14-15% nur NOS-Immunreaktivität, weniger als 3% nur SP-Immunreaktivität, etwa zu gleichem prozentualen Anteil von 3% NOS-und gleichzeitig SP-Immunreaktivität. Mehr als 80% der markierten Ganglienzellen zeigten weder NOS- noch SP-Immunreaktivität. Detaillierte Daten wurde in der Tabelle 5 und Abb.7 zusammengefaßt.

Kontrollen: NOS/SP: Wurde der NOS-Antikörper durch das Serum eines nicht immunisierten Kaninchens und durch PBS ersetzt, zeigte sich keine Immunreaktivität. Die Präabsorption des NOS-Antikörpers mit NOS-Antigen und SP-Antikörper mit SP führte in beiden Fällen zu einem vollständigen Verlust der Immunreaktivität.

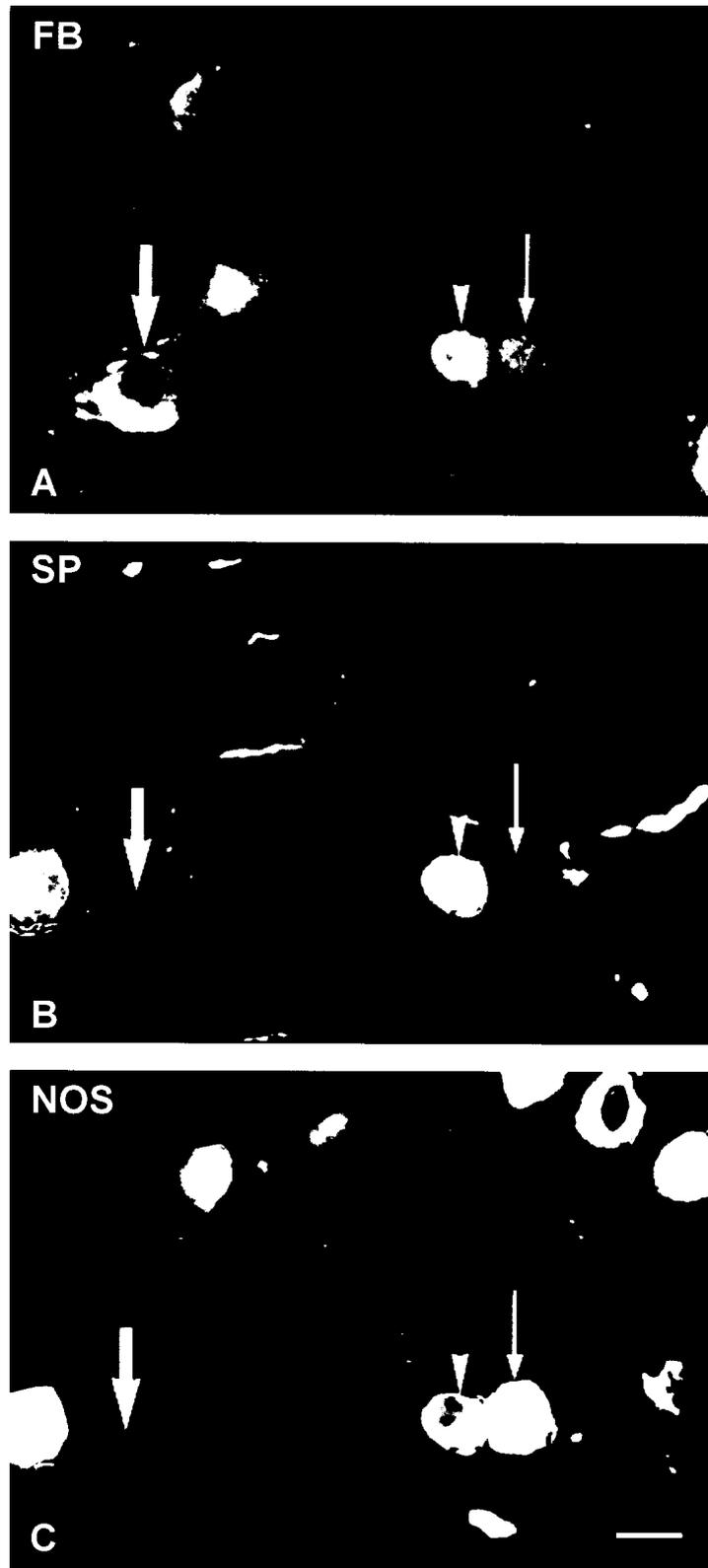


Abb.6a: Korrelation von SP-und NOS-Immunreaktivität in retrograd-markierten Ganglienzellen des Ganglions jugulare/nodosum der Maus.

(A,B,C) retrograd-markierte Ganglienzelle enthält beide Immunreaktivität (Pfeilspitzen), andere zeigt keine SP-und NOS-Immunreaktivität (große Pfeile), das retrograd-markierte Neuron ist NOS-, aber nicht SP-immunreaktiv (kleine Pfeile). Balken = 20µm.

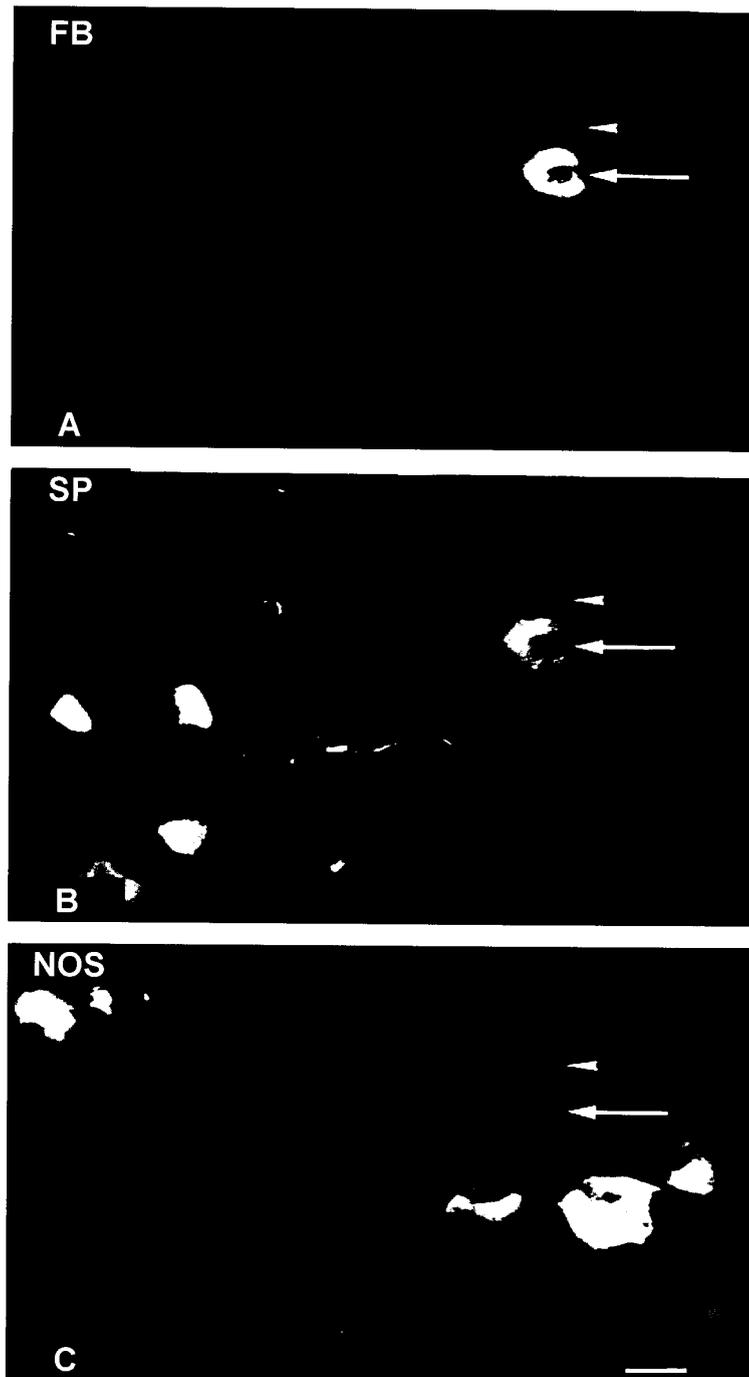


Abb.6b: Korrelation von SP-und NOS-Immunreaktivität in retrograd-markierten Ganglienzellen des Ganglions jugulare/nodosum der Maus.

(A,B,C) zwei benachbarte retrograd-markierte Neurone, eines von ihnen enthält SP-, aber keine NOS-Immunreaktivität (Pfeile), das andere Neuron ist weder immunreaktiv für NOS noch für SP (Pfeilspitzen). Balken = 20 μ m.

Tab. 6: Korrelation von NOS mit SP in retrograden markierten vagal-sensiblen Ganglienzellen

		Gesamt		FB	FB/NOS		FB/NOS/SP		FB/SP	
		n	n	%	n	%	n	%	n	%
Nr.1	Ganglion jugulare/nodosum (Komplex), re.	122	99	82	16	13	3	2	4	3
	Ganglion jugulare/nodosum (Komplex), li.	121	89	74	25	21	3	2	4	3
Nr.2	re.	1070	857	80	135	13	50	5	28	2
	li.	252	208	83	31	12	10	4	3	1
Nr.3	re.	1419	1116	80	271	19	18	1	14	1
	li.	1390	1010	73	352	25	17	1	11	1
Nr.4	re.	1086	770	71	231	21	27	3	58	5
	li.	1053	780	74	208	20	28	3	37	3
Nr.5	re.	651	549	84	51	8	26	4	25	4
	li.	721	568	79	94	13	28	4	31	4
Nr.6	re.	844	769	91	29	3	23	3	23	3
	li.	947	817	86	78	8	32	4	20	2
Σ		9676	7632	957	1521	176	265	36	258	32
x				79.7		14.6		3		2.7

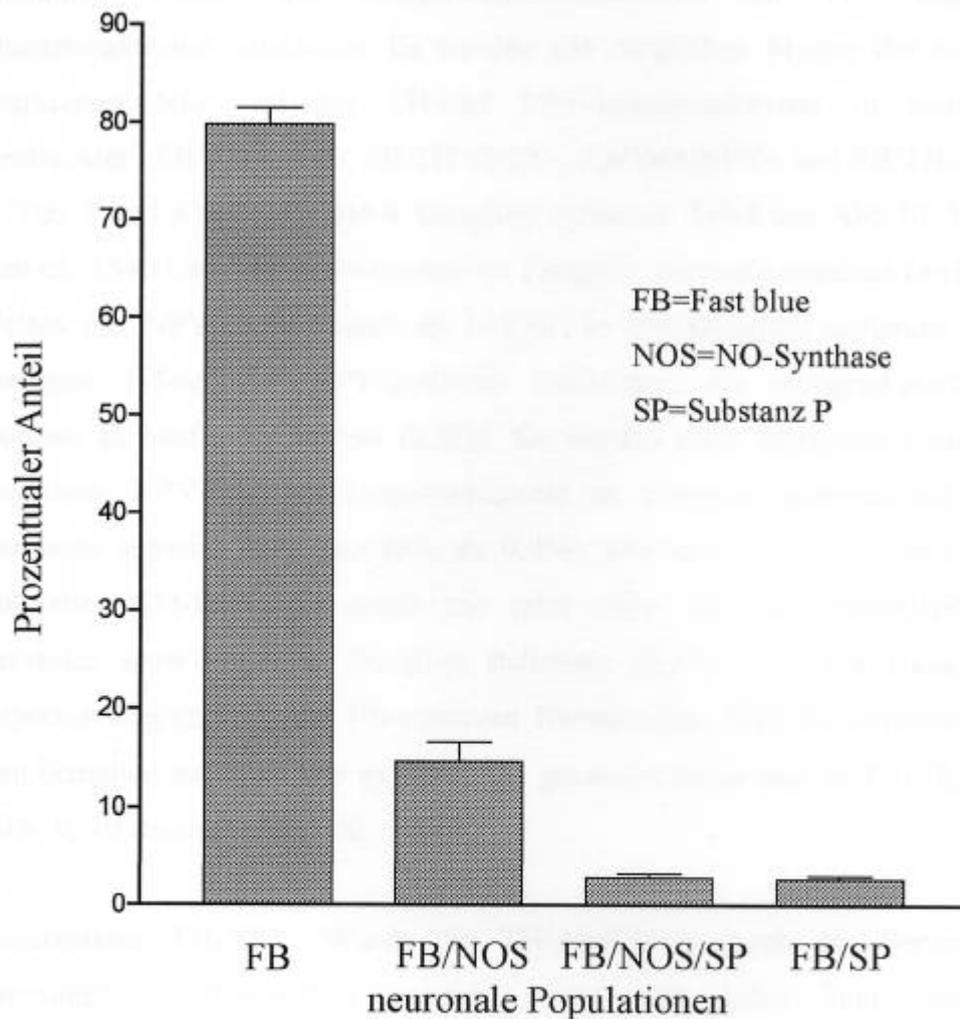


Abb.6 Anteile der neuronalen Populationen an der vagal-sensiblen Atemwegsinnervation der Maus (Ggl.jug/nod)

Übersicht über die Verteilung der neuronalen Populationen der extrinsic Innervation der Lunge der Maus. Von den retrograd markierten Neuronen (9676) sind 7632 Neurone nur FB positiv (79,7%), 176 Neurone FB und gleichzeitig NOS (14,6 %), bei 36 Neuronen alle drei Markers FB, NOS und SP positiv (3%), und bei 32 Neurone nur SP positiv (2,7 %).

3.2.2 Sympathische Ganglien

Die retrograd-markierten Neurone im Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum wurden mit Doppelimmunhistochemie auf TH- und/oder NPY-Immunreaktivität untersucht. Es wurden alle möglichen Muster der Koexistenz von markierten Neuronen mit TH- und NPY-Immunreaktivität in beiden Ganglien beobachtet: FB/TH-/NPY-, FB/TH+/NPY-, FB/TH+/NPY+ und FB/TH-/NPY+ (SCG: s. Tab. 7 und Abb. 8a, 8b und 9; Ganglion stellatum: Tab. 8 und Abb. 10, 11a, 11b). Von den ca. 15400 markierten Neuronen im Ganglion cervicale superius (n=12) zeigten 34 Zellen nur NPY-Immunreaktivität (0,2%). In den Ganglien stellatum wurden diese wenigen TH-negativen/NPY-positiven Zellkörper, die retrograd-markiert wurden, doppelt so häufig beobachtet (0,4%). Es wurden mehr markierte Neurone mit TH-negativer/ NPY-negativer-Immunreaktivität im Ganglion stellatum als im Ganglion cervicale superius gefunden (6% zu 0,8%). Die übrigen markierten Ganglienzellen enthielten TH-Immunreaktivität mit oder ohne NPY-Immunreaktivität (Ganglion cervicale superius: 99%, Ganglion stellatum: 93,5%). In den Ganglien cervicale superius zeigten 43% der FB-positiven Nervenzellen TH/NPY-Immunreaktivität, bei den Ganglien stellatum war es 38%. Die gesamten Daten sind in Tabelle 7 bzw. 8 und Abb. 9, 10 zusammengestellt.

Kontrollen: TH/NPY: Wurde der TH-Antikörper durch das Serum eines nicht immunisierten Kaninchens ersetzt, zeigte sich keine Immunreaktivität. Die Präabsorption des NPY-Antikörpers führte zu einem vollständigen Verlust der Immunreaktivität.

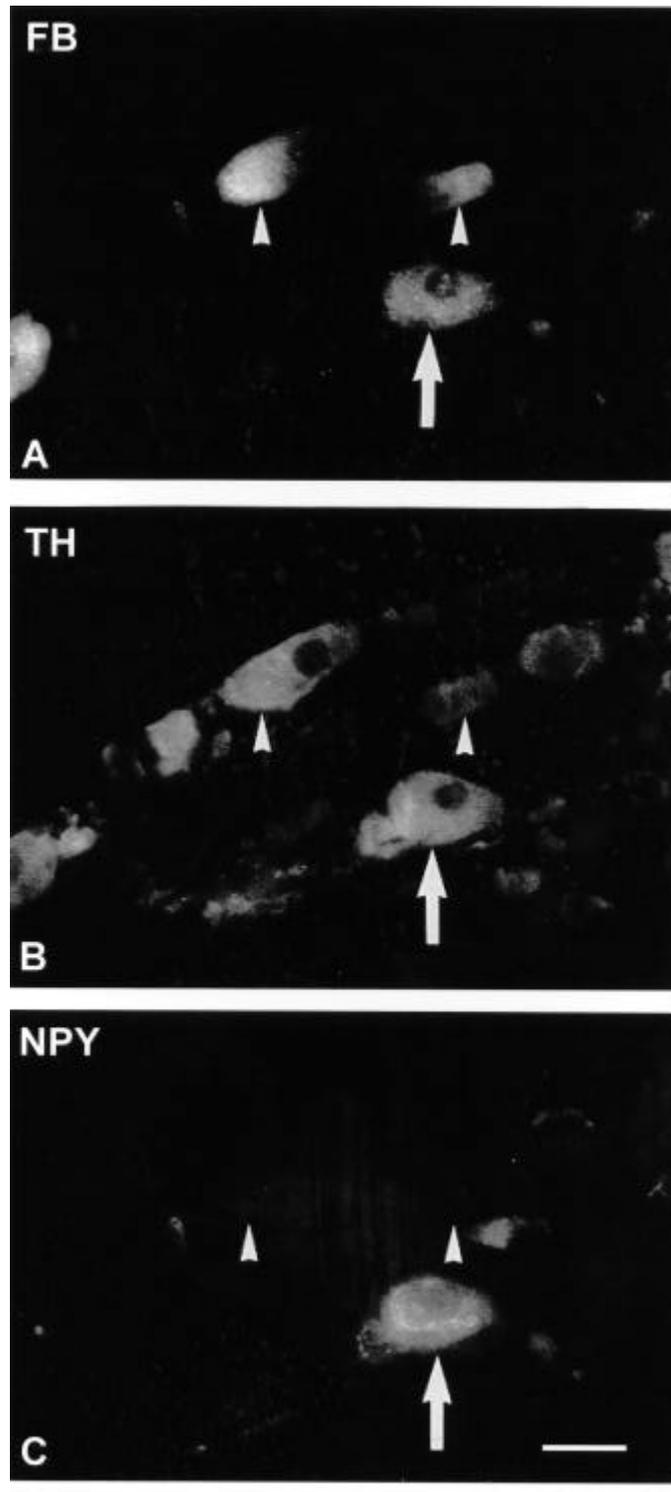


Abb.8a: Immunhistochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neuronen der Maus.

(A,B,C) Ganglion cervicale superius, einige sympathische Neurone sind retrograd mit Fast Blue angereichert, eines von ihnen enthält sowohl TH- als auch NPY-Immunreaktivität (große Pfeile), während die anderen TH-, aber keine NPY-Immunreaktivität zeigen (Pfeilspitzen). Balken = 20 μ m.

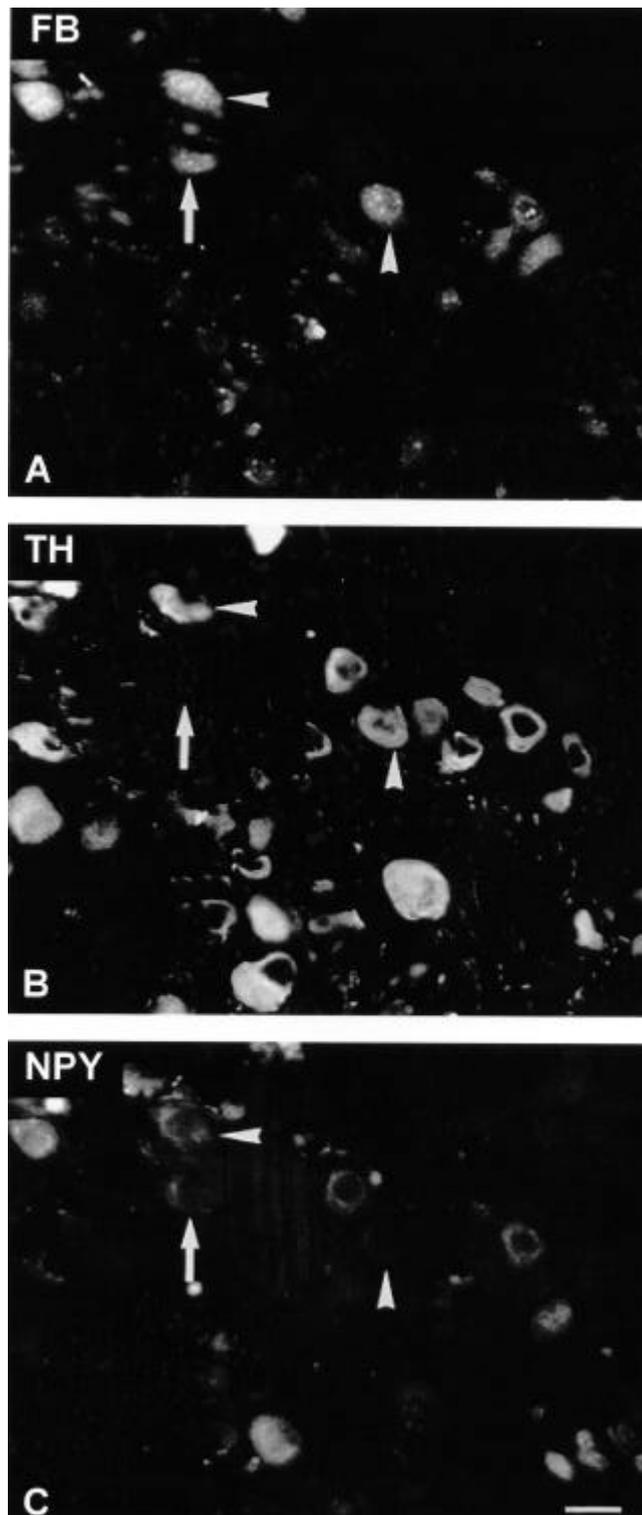


Abb.8b: Immun histochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neuronen der Maus

(A,B,C) Ganglion cervicale superius, das retrograd markierte Neuron enthält keine TH-Immunreaktivität, aber NPY-Immunreaktivität (Pfeile), während die anderen abgebildeten Neurone TH- und NPY-Immunreaktivität zeigen (Pfeilspitze).

Balken = 20µm.

Tabelle 7:

Korrelation von TH mit NPY in retrograd-markierten sympathischen postganglionären Neuronen der Maus

		Gesamt	FB		FB/TH	FB/TH/NPY	FB/NPY			
		n	n	%	n	%	n	%	n	
Nr. 1	Ggl. cerv. superius, re.	137	5	4	45	33	87	63	0	0
	Ggl. cerv. superius, li.	65	1	1	39	60	25	39	0	0
Nr. 2	re.	68	1	1	37	55	30	44	0	0
	li.	120	2	2	54	45	64	53	0	0
Nr. 3	re.	1720	30	1,7	784	45,6	895	52	11	0,6
	li.	1493	15	1	912	61	565	38	1	0,1
Nr. 4	re.	2298	7	0,3	1157	50	1127	49	7	0,3
	li.	1819	37	2	1140	62,7	638	35	4	0,2
Nr. 5	re.	3437	13	0,4	1587	46	1831	53	6	0,2
	li.	1741	1	0,05	956	55	782	45	2	0,1
Nr. 6	re.	1313	1	0,08	781	60	529	40	2	0,1
	li.	1623	19	1	1109	68	494	30	1	0,06
Σ		15834	132		8601		7067		34	
x				1,21		53,44		45,08		0,14

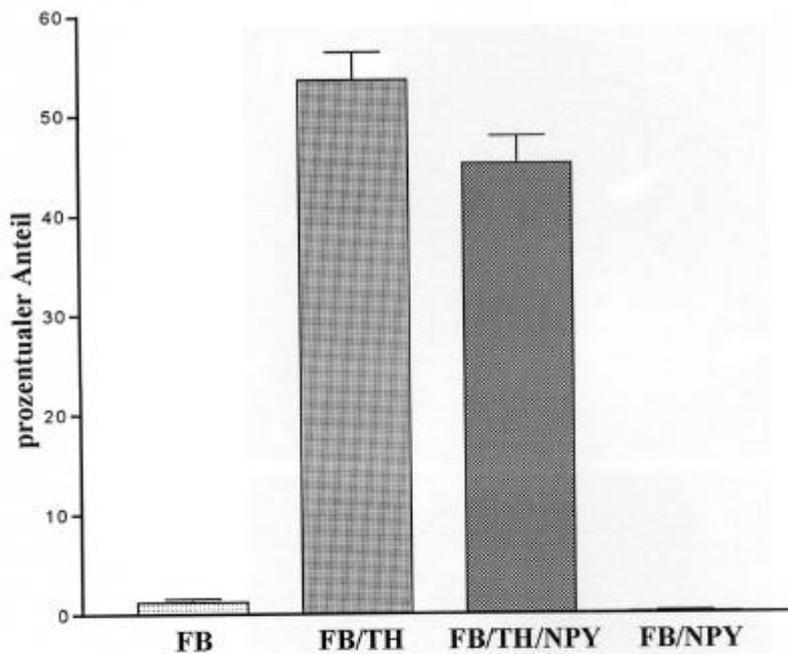


Abb.8 Anteile von neuronalen Populationen an der sympathischen Atemwegsinnervation der Maus (SCG)

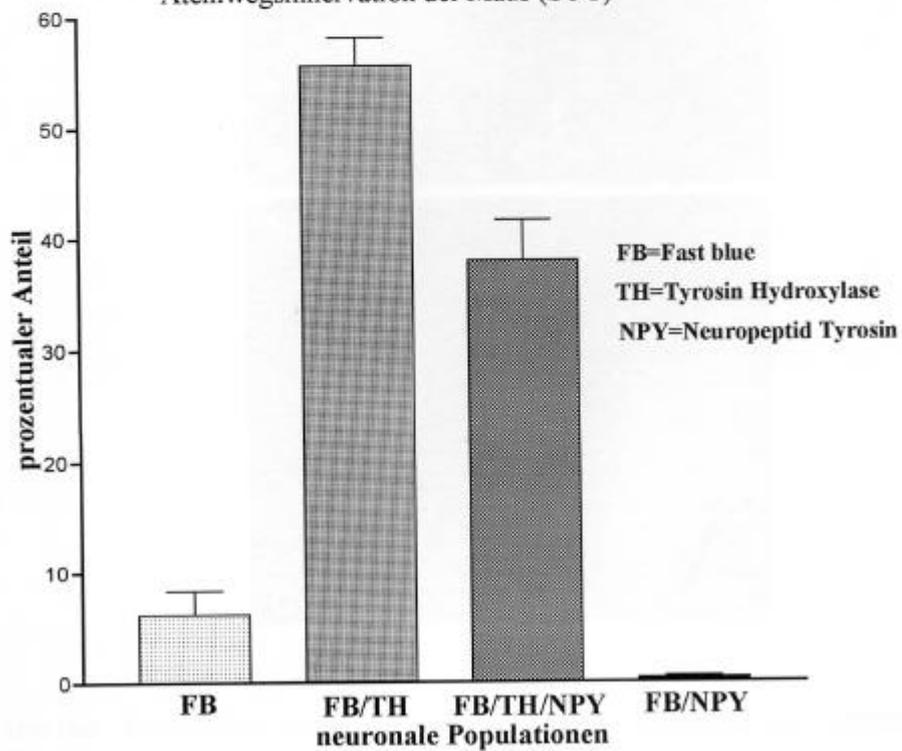


Abb:9 Anteile der neuronalen Populationen an der sympathischen Atemwegsinnervation der Maus (Ggl. stellatum). Die Diagramme mit den MW±SEM wurden mit dem Graph Pad Prism Programm dargestellt. Siehe Tabelle7 und 8.

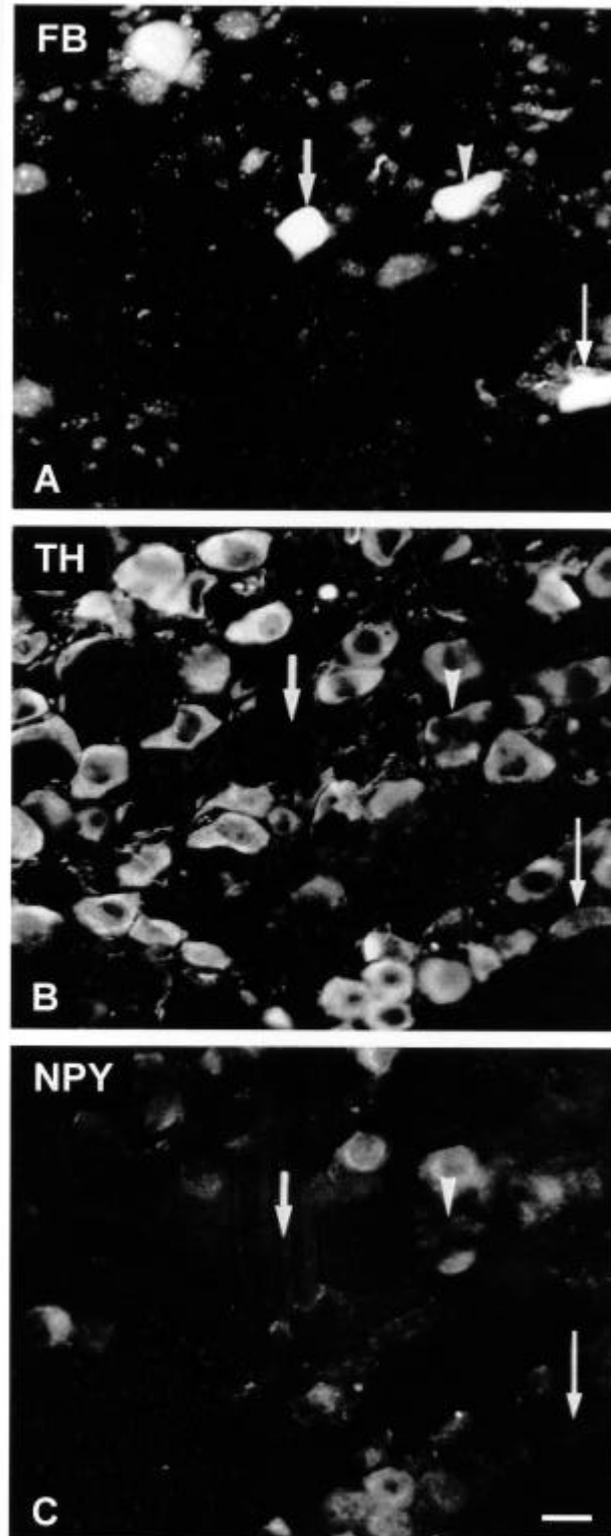


Abb.10a: Immunhistochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neuronen der Maus.

(A,B,C) Ganglion stellatum; das mit Fast Blue angereicherte Neuron zeigt sowohl keine TH- als auch NPY-Immunreaktivität (dicke Pfeile). Dieses retrograd-markierte Neuron enthält beide TH- und NPY-Immunreaktivität (Pfeilspitzen). Das mit Fast Blue markierte Neuron ist immunreaktiv für TH (dünnere Pfeil), aber nicht für NPY. Balken = 20 μ m.

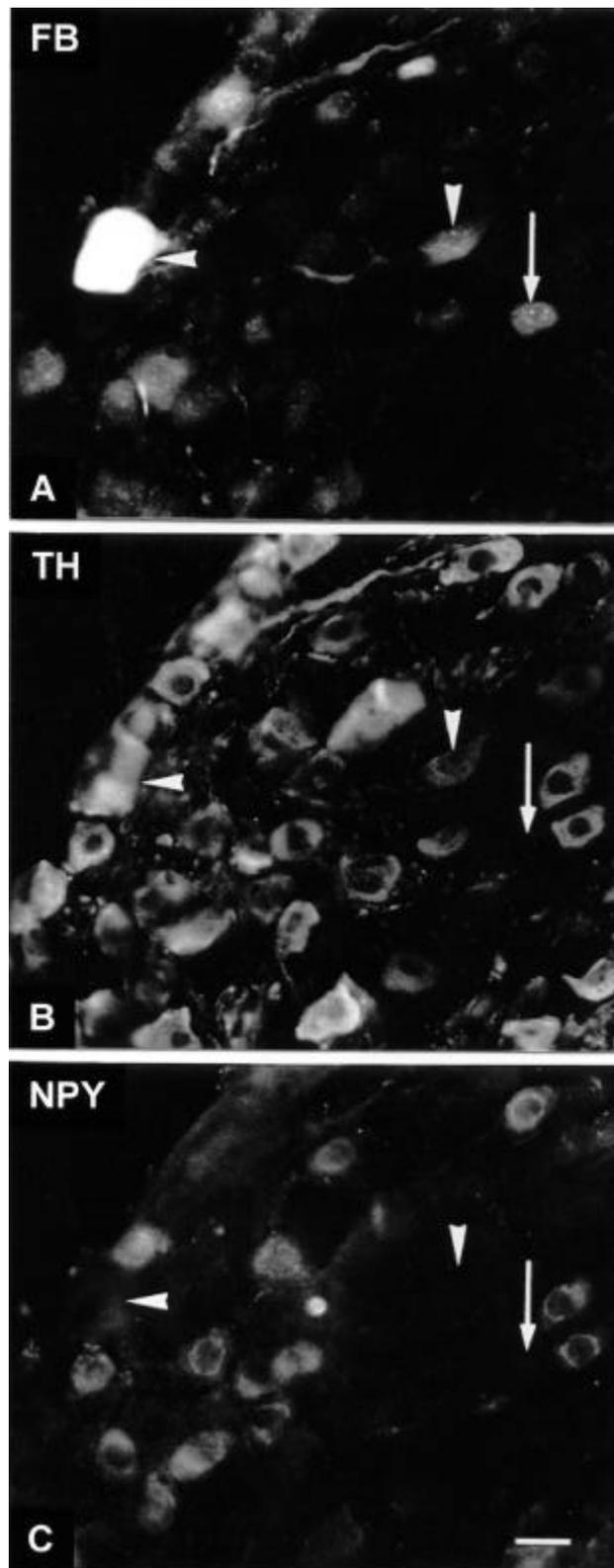


Abb.10b: Immunhistochemie retrograd-markierter sympathischer postganglionärer Neuronen der Maus
 (A,B,C) Ganglion stellatum; dieses Neuron enthält Fast Blue und TH-Immunreaktivität, aber keine NPY-Immunreaktivität (Pfeilspitzen), nur wenige sind doppelt negativ für TH und für NPY-Immunreaktivität (Pfeile). Balken = 20 μ m.

Tabelle 8 Korrelation von TH mit NPY in retrograd-markierten sympathischen postganglionären Neuronen der Maus

		Gesamt		FB		FB/TH		FB/TH/NPY		FB/NPY	
		n	n	%	n	%	n	%	n	%	
Nr. 1 Ganglion stellatum, rechts		35	0	0	21	60	14	40	0	0	
	links	4	1	25	3	75	0	0	0	0	
Nr. 2	rechts	132	17	13	68	51	47	36	0	0	
	Links	77	3	4	47	61	26	34	1	1	
Nr. 3	rechts	531	70	13	220	42	234	44	7	1	
	links	392	18	5	214	55	156	40	4	1	
Nr. 4	rechts	808	4	0,5	512	63,5	292	36	0	0	
	Links	872	52	6	414	47	398	46	8	1	
Nr. 5	rechts	1256	20	1,5	715	57	517	41	4	0,5	
	links	2840	75	3	1383	49	1375	48	7	0	
Nr. 6	rechts	797	16	2	440	55	339	43	2	0	
	links	859	11	1	442	52	405	47	1	0	
Σ		8603	287		4479		3803		34		
x				6,1		55,6		37,9		0,4	

3.3 Korrelation von SP mit NOS bzw. von TH mit NPY in den zu den unteren Atemwegen projizierenden Nervenfasern der Maus.

3.3.1 Korrelation von SP mit NOS

Es wurden SP-oder NOS-positive Nervenfasern in der glatten Muskulatur der Atemwege um seromuköse Drüsen und in der Lamina propria mucosae gefunden, zum Teil befand sich diese Lokalisation in enger Nachbarschaft. Eine Kolokalisation von SP-und NOS-Immunreaktivität in den unteren Atemwegen der Maus wurde nur sehr selten angetroffen (Abb.12, a, b).

Kontrolle: Wie bei 3.1.1 beschrieben wurden die Nervenfasern untersucht, es zeigte sich auch hier keine Immunreaktivität für NOS und SP.

3.3.2 Korrelation von TH mit NPY

Nervenfasern mit TH-Immunreaktivität bilden ein dichtes Netz um die Blutgefäße. Die Mehrzahl der TH-immunreaktiven Nervenfasern zeigen eine Kolokalisation mit NPY-Immunreaktivität. Es wurden alle möglichen Kombinationen von TH-und/oder NPY-positiven Nervenfasern in den unteren Atemwegen der Maus gefunden (Abb.13 c,d).

Kontrolle: Das Lungengewebe wurde wie bei 3.2.1 beschrieben inkubiert, auch hier wurde keine Immunreaktivität für TH und NPY beobachtet.

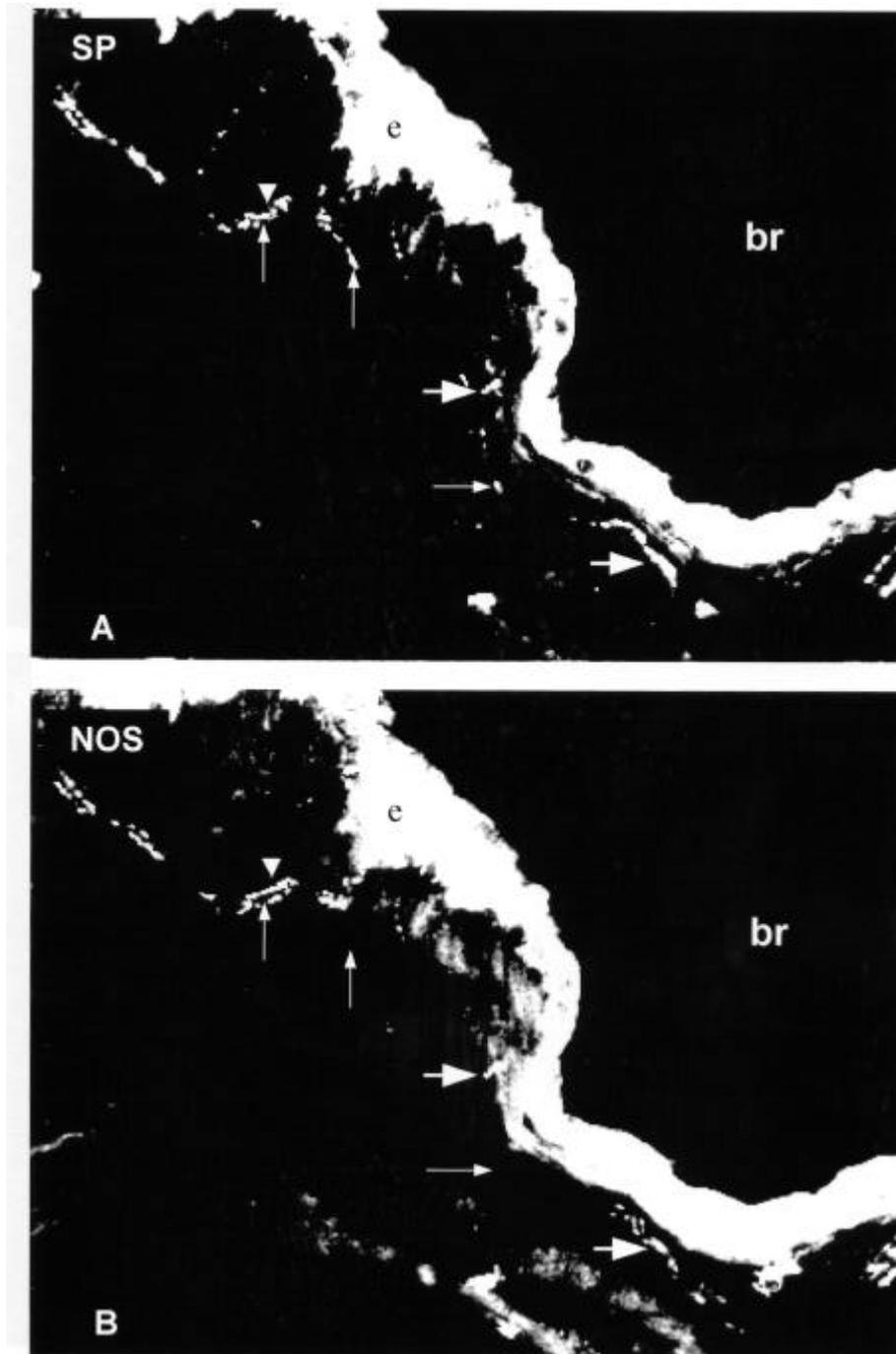


Abb.12 Korrelation von SP- und NOS-Immunreaktivität in den Nervenfasern der unteren Atemwegen der Maus

(a,b) glatte Muskulatur eines Bronchus: SP-(a) und NOS-Immunreaktivität in den Nervenfasern liegen eng benachbart, sind aber nicht kolokalisiert (Pfeilspitzen), weniger Nervenfasern zeigen eine Kolokalisation von SP- und NOS-Immunreaktivität.

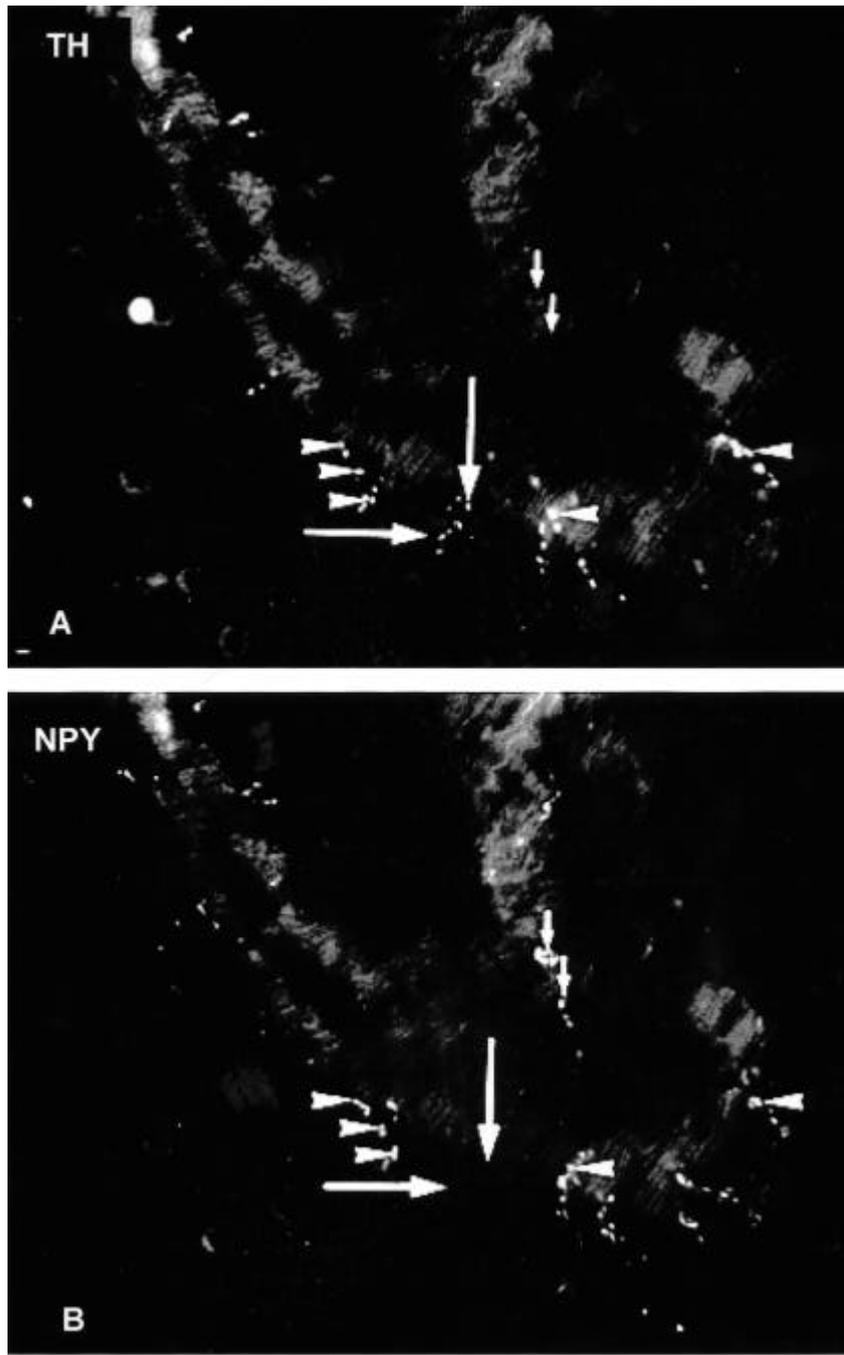


Abb.13 Korrelation von TH- und NPY-Immunreaktivität in den Nervenfasern der unteren Atemwegen der Maus

(c,d) Lungengefäß: TH-(c) und NPY-Immunreaktivität (d) sind kolokalisiert (Pfeilspitzen), andere Nervenfasern zeigen keine TH-, aber NPY-Immunreaktivität (kleine Pfeile), diese Nervenfasern sind immunreaktiv für TH, aber nicht für NPY (große Pfeile).

4. Diskussion

4.1 Retrograde neuronale Markierung

4.1.1 Injektionsstelle

Die Innervation der Atemwege der Maus mittels retrograden neuronalen Tracing-Methoden wurde bisher noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die sensible und sympathische Innervation der Atemwege der Maus unter normalen Bedingungen untersucht. Das Ziel war die Charakterisierung der sensiblen und sympathischen Innervation der unteren Atemwege bezüglich der Herkunft der Nervenfasern und deren Gehalt an Mediatoren, die für die Regulation der Atemwegsfunktion Bedeutung haben. Durch die Bestimmung der Lage und der Anzahl der Perikaryen mit Projektion zu den Atemwegen sowie deren Neuropeptidgehalt konnte eine qualitative und quantitative Aussage über die Herkunft der sensiblen und sympathischen Innervation gemacht werden. Die Perikaryen der zu den Atemwegen projizierenden Neuronen wurden hinsichtlich deren Neuropeptide (Vagusganglien mit spezifischen Antikörpern gegen NOS und SP, sympathische Ganglien mit Antikörpern gegen TH und NPY) immunhistochemisch untersucht.

Mit dem gleichen Ziel wurde in einer umfangreichen Studie der Farbstoff (Fast Blue bzw. Fluoro-Gold) mit einer Mikropipette in die Trachea oder in den Hilus der Lunge des Meerschweinchens, nachdem das Tier rechtsseitig thorakotomiert wurde, injiziert (Kummer et al.1992b). In der vorliegenden Arbeit wurde der Tracer Fast Blue hingegen in den rechten Hauptbronchus intraluminal verabreicht. In dem unteren luminalen Anteil der Trachea bis in den Segmentbronchien war Akkumulation von Fast blue zu sehen. Der Tracer verteilte sich intraluminal bis zu den Bronchiolen und über das gesamte Lungenparenchym bis zur Pleura visceralis. Bei einigen Tieren wurde Fast Blue sogar in dem linken Hauptbronchus gefunden. Eine Erklärung hierfür war, daß durch Husten der Farbstoff den linken Hauptbronchus erreichen konnte.

Durch retrograde neuronale Markierung mit Fast blue konnte eine Beteiligung der sensiblen Vagusganglien (Ganglion nodosum) an der Innervation der Speiseröhre der Maus nachgewiesen werden (Sang et al. 1998). Im lockeren Bindegewebe sowie in den Wandschichten der Speiseröhre wurde bei dieser Arbeit kein Farbstoff gesehen. Somit konnte erstmals eine getrennte Aussage über die Innervation der Atemwege gemacht werden.

4.1.2 Sensible Ganglien

Eine bilaterale vagal-sensible Innervation der Lunge bei der Maus konnte in Degenerations-Experimenten sehr früh gezeigt werden (Honjin 1956). In späteren Studien mittels retrogradem Transport von Meerrettich-Peroxidase an der Katze (Kalia & Mesulam 1980) sowie mittels retrograden Tracing-Methoden an der Ratte (Springall et al. 1987) konnten eine bilaterale vagal-sensible sowie eine spinale Beteiligung an der Innervation der Trachea und der Lunge gezeigt werden. In der Untersuchung mit der Injektion von Pseudorabbies in den Hauptbronchus der Ratte konnte trotz der kontralateralen Vagotomie infizierte Neurone in den beidseitigen sensiblen Vagusganglien nachgewiesen werden (Fontan 2000). Es ist daher anzunehmen, daß die rechte Lunge sowohl von dem rechten als auch von dem linken sensiblen Vagusganglien versorgt wird.

In dieser Arbeit wurden die Spinalganglien nicht untersucht. Die sensiblen Vagusganglien (Ganglion jugulare und Ganglion nodosum) wurden als ein Komplex ausgewertet. Da die beiden Ganglien anatomisch sehr dicht aneinander liegen, war eine getrennte Präparation der Ganglien nicht möglich. Es wurde daher keine getrennte Aussage über die Anzahl der retrograd-markierten Neurone in den Ganglien jugulare einerseits und den Ganglien nodosum andererseits gemacht. Bei dem Meerschweinchen konnte durch die Injektion eines Tracers (Fast Blue oder Fluoro-Gold) das Ganglion nodosum als die Hauptquelle (Ganglion nodosum 65%, Ganglion jugulare 35%) der sensiblen Innervation der Atemwege gezeigt werden (Kummer et al. 1992b). Obwohl der Tracer bei diesem Experiment in den rechten Hauptbronchus injiziert wurde, kamen etwa 55% der sensiblen Nervenfasern aus dem Nervus vagus von der rechten, während die linke Seite mit 45% zu der Innervation beiträgt. Bisher gibt es auch bei anderen Spezies keine quantitativen Studien darüber, so daß ein direkter Vergleich oder eine Bestätigung dieses Ergebnisses noch offen bleibt. Dieses Ergebnis läßt aber zwei Interpretationen zu: Die rechte Lunge wird sowohl von rechts als von links in fast gleiche Intensität innerviert oder der Tracer gelangt durch Husten in den linken Hauptbronchus und trägt fälschlicherweise zur Auswertung bei, da bei einigen Tieren Tracer in dem linken Hauptbronchus gesehen wurden. Bei Injektion des Tracers in die Trachea wurde eine Dominanz der rechten sensiblen Vagusganglien an der Innervation der Trachea nachgewiesen (re. 61% zu li. 39%, Kummer et al. 1992b).

4.1.3 Sympathische Ganglien

Bisher wurde die sympathische Innervation der Lunge der Maus mittels neuronalem retrograden Tracings noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal eine quantitative Aussage über eine Beteiligung der sympathischen Ganglien (Ganglion cervicale superius bzw. Ganglion stellatum) an der Innervation der unteren Atemwege der Maus getroffen. In Studien an der Maus (Baluk & Gabella 1987) und an dem Meerschweinchen (Smith & Satchell 1985) wurde gezeigt, daß das Ganglion cervicale superius den größten Teil an der sympathischen Innervation der Trachea beiträgt, während es bei der sympathischen Innervation der Lunge des Meerschweinchens Hinweis für eine dominantere Rolle des Ganglions stellatum gibt (Kummer et al.1992b). Für die Lunge der Maus erwies sich das Ganglion cervicale superius als die Hauptquelle der sympathischen Innervation (Ganglion cervicale superius: 67%,Ganglion stellatum 33%). Ähnlich wie bei der vagal-sensiblen als auch bei der sympathischen Innervation der Atemwegen der Maus wurde eine dominantere Rolle der rechten gegenüber der linken Seite gefunden (54% von re. zu 46% von li.). Kummer und Mitarbeiter (1992b) fanden retrograd-markierte sympathische Neurone, die zu der Trachea ziehen, hauptsächlich auf der rechten Seite (70%).

4.2 Immunhistochemie von retrograd-markierten Neuronen

4.2.1 Sensible Ganglien

Für die meisten Spezies ist bekannt, daß die sensible Innervation der Atemwege von den Ganglien jugulare und nodosum des Nervus vagus und den zervikalen und thorakalen Spinalganglien ihren Ursprung nimmt (Dalsgaard & Lundberg 1984, Springall et al. 1987, Dey et al. 1990, Kummer et al. 1992b). Die immunhistochemische Untersuchung der sensiblen Ganglien des Meerschweinchens zeigte die Existenz von TH+, SP-/Dynorphin+, SP+/ Dynorphin+, SP+/CGRP+, und CGRP+ neuronalen Populationen (Kummer et al.1988, 92a, 92b, Martling et al.1988). In weiteren Studien wurden NOS-positive Neurone in sensiblen Vagusganglien des Meerschweinchens und des Mensch gefunden (Aimi et al. 1991, Fischer et al.1993, Fischer und Hoffmann 1996). Es ist bekannt, daß die neuronalen Populationen mit Projektion zu den Atemwegen des Meerschweinchens in den sensiblen Vagusganglien untereinander als

auch von den Spinalganglien in ihrer Qualität und Quantität sich unterscheiden (Kummer et al. 1992b).

Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung der sensiblen Atemwegsinnervation hinsichtlich der Lage der Perikaryen der beteiligten Neurone und deren Mediatoren (SP, NOS). Die mit dem Farbstoff angereicherten Neurone wurden auf die Korrelation von SP- und NOS-Immunreaktivität (indirekter Nachweis für NO) untersucht. SP und NO spielen in der jüngsten Zeit eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale (Belvisi et al. 1992, 93, Di Maria et al. 2000, Joos et al. 2000a, Ward et al. 1993)

Korrelationsuntersuchungen der retrograd markierten Neurone der sensiblen Vagusganglien der Maus wurden bisher noch nicht vorgenommen. Bei dieser Arbeit wurden alle möglichen Kombinationen der markierten Neurone mit SP- und/oder NOS-Immunreaktivität beobachtet: FB/SP+/NOS–(I), FB/SP+/NOS+(II), FB/SP–/NOS+(III), FB/SP–/NOS–(IV).

I. Retrograd-markierte Neurone mit SP+/NOS– -Immunreaktivität.

Im Gegensatz zu anderen Studien mit der Injektion des Farbstoffes in die Trachea des Meerschweinchens zeigte sich bei der vorliegenden Untersuchung eine sehr geringere Anzahl der markierten Neurone mit Projektion zu den unteren Atemwegen der Maus SP-Immunreaktivität (etwa 6%). SP-, NKA- und CGRP-immunreaktive Neurone mit Projektion zu der Trachea des Meerschweinchens und der Ratte wurden hauptsächlich im Ganglion jugulare und nur wenig im nodosum (<1%) gefunden. Die Herkunft der meisten SP-/CGRP-positiven Nervenfasern in den Atemwegen des Meerschweinchens konnten im Ganglion jugulare nachgewiesen werden. (Kummer et al. 1992b, Springall et al.1987)

Ergebnisse anderer Experimente mit der Transsektion des Vagus propagierten das Ganglion nodosum als Ursprung der SP- und CGRP-positiven Nervenfasern in den Atemwegen des Meerschweinchens (Terenghi et al.1983) und der Katze (Dey et al.1990). Eine Transsektion des Vagus unterhalb des Ganglions nodosum führte zu einer Reduktion der Anzahl SP-positiver/CGRP-positiver Nervenfasern in den Atemwegen von mehr als 90%, während eine Vagotomie oberhalb des nodosums keine Reduzierung dieser Nervenfasern verursacht. Dieses Ergebnis spricht aber nicht gegen einen Ursprung SP- und CGRP-positiver Nervenfasern im Ganglion jugulare. Für die Maus

können solche Aussagen nicht getroffen werden, da beide Ganglien als Komplex vorliegen. Die Substanz P-positiven retrograd-markierten Neurone waren in einer bestimmten Region auf den Serienschnitten lokalisiert. Da die beiden vagalen Ganglien nicht getrennt ausgewertet wurden, konnte nicht gezeigt werden, ob die Anhäufung SP-positiver retrograd-markierter Neurone auf dem immunhistologischen Schnitt in einer bestimmten Region innerhalb des Ganglions jugulare oder nodosum lokalisiert war.

Weniger als 6% der retrograd markierten Neurone war immunreaktiv für SP. Dieses Ergebnis liegt vielleicht in der Natur der Maus. Es wurde berichtet, daß die Anzahl der SP-positiven Nervenfasern in den Atemwegen der Maus (Pack et al.1984) geringer ist als die des Meerschweinchens und der Ratte. Die SP-positiven Nervenfasern sind zahlreich im Epithel der Trachea des Meerschweinchens und der Ratte zu finden (Baluk et al.1992, Lundberg et al. 1984).

Den Tachykininen wird eine pathogenetische Rolle bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, zum Beispiel bei der Colitis ulcerosa (Mantyh et al. 1989) und bei der Rheumatoiden Arthritis (Levine et al. 1985), zugeschrieben. In den Atemwegen wurde eine durch Substanz P verursachte Bronchokonstriktion (Martling et al. 1987), Gefäßerweiterung (Martling et al. 1987, McCormack et al. 1989) und Austritt von Blutplasma in den extravasalen Raum (Saria et al. 1983) nach Stimulation sensibler Nerven beschrieben. Diese Befunde werden durch die Freisetzung von SP aus sensiblen Axonen im Sinne eines Axonreflexes verursacht (Barnes et al. 1986).

Capsaicin-sensitiven C-Nervenfasern der Atemwegen des Meerschweinchens enthalten Tachykinine (SP, NKA) und Ursprung dieser Nervenfasern könnte SP/NKA-positiv retrograd-markierte Neurone in sensiblen Vagusganglien sein. Eine Vorbehandlung mit dem selektiven zu den sensiblen Neuropeptiden neurotoxischen Capsaicin führte zu einer Abnahme der durch den Zigarettenrauch verursachten mikrovaskulären Extravasation in der Trachea der Ratte (Lundberg et al.1983b) und des Meerschweinchens (Kuo et al.1990). Die durch aerosolisierte Antigene erzielte Atemwegshyperreaktivität bei den sensibilisierten und provozierten Meerschweinchen war nach einer Behandlung mit Capsaicin verschwunden (Matsuse et al. 1991). Die Behandlung mit Capsaicin führte offensichtlich zu einer Reduktion der capsaicin-tachykinergen Nerven und so zu einer Reduzierung der Effekte endogener Tachykinine auf die Atemwege. Eine passive Immunisierung des Meerschweinchens mit Anti-SP-Antikörpern verhinderte den durch SP und NKA verursachten Bronchospasmus (Jafarian et al.1995).

Andere experimentelle Arbeiten untersuchten die Effekte der allergischen Atemwegsentzündung auf die Tachykinin-Biosynthese. Bei den ovaalbumin-sensibilisierten und provozierten Meerschweinchen wurde eine Induktion des Tachykinin-Genes (PPT-A) und eine vermehrte Peptid-Expression im Ganglion nodosum mit verschiedenen Methoden nachgewiesen (Fischer et al. 1996a). Ein 3- bis 4-facher Anstieg von SP-, NKA- und CGRP-Levels in den Lungengewebe der sensibilisierten Meerschweinchen 24 Stunden nach der inhalativen Allergenprovokation wurde mit Radioimmunoassay gemessen. Der prozentuale Anteil der SP-/NKA-immunreaktiven Neurone im Ganglion nodosum mit Projektion zu den Atemwegen steigt von 0,2% bei Kontrolltieren auf 10,4% bei den behandelten Tieren nach 24 Stunden Allergen-Provokation. Im Weiteren wurde der Mechanismus der Induktion des Tachykinins untersucht. Mit der In-situ-Hybridisierung konnte der Anstieg der PPT-mRNA auf Ebene der Genexpression bestätigt werden. Bereits 12 Stunden nach der inhalativen Allergenprovokation konnte ein relativer Anstieg der β -Präprotachykinin (β -PPT)-mRNA-exprimierenden sensiblen Neurone im Ganglion nodosum beobachtet werden. Nach weiteren 12 Stunden ist wieder ein den Kontrolltieren vergleichbarer Anteil erreicht. Die vermehrte Expression der β -PPT-mRNA im Ganglion nodosum ist auf eine kurzfristige Induktion in Neuronen zurückzuführen.

Zu den stärksten Induktoren und Regulatoren der Tachykinin-Biosynthese zählen neurotrophe Faktoren wie NGF und Brain Derived-Neurotrophic (BDNF) (Lindsay et al. 1989). Eine Injektion von NGF in die Trachea des Meerschweinchens steigert nicht nur die SP-Expression in Neuronen des Ganglions nodosum, sondern führt auch zu einer phänotypischen Veränderung der Neuronen. Diese sind auf einmal in der Lage SP zu produzieren (Hunter et al. 2000). NGF-transgene Mäuse sind aufgrund der verstärkten NGF-Überexpression empfindlicher gegenüber der Capsaicin verursachten Atemwegshyperreaktivität im Vergleich zu normalen Mäusen (Hoyle et al. 1998). Diese Befunde zeigen die Veränderbarkeit des Neurons unter verschiedenen Bedingungen und charakterisieren den Begriff neuronale Plastizität.

Plastizität sensibler Neurone bezüglich des Tachykinin- und CGRP-Metabolismus wurde im Rahmen der neurogenen Entzündung beschrieben. Im Rattenmodell induzierte Entzündungen wurden durch erhöhte SP-beziehungsweise Tachykininspiegel in Spinalganglien und im peripheren Nerven festgestellt (Mapp et al. 1993), wobei es im entzündeten Gewebe auch zu einem Aussprossen CGRP-immunreaktiver Nervenfasern kommt (Weihe et al. 1988). Die vorliegende Arbeit liefert Daten über die sensible

Innervation der Maus unter normalen Bedingungen und die Grundlagen für weiteren Fragen nach der sensiblen Innervation der Maus unter pathologischen Bedingungen, wie bei der allergischen Atemwegsentzündung.

II. Retrograd markierte Neurone mit SP+ und NOS+- Immunreaktivität .

Von den 6% SP-positiven sensiblen Neuronen enthielten etwa 3% zusätzlich NOS-Immunreaktivität. Neuronen des Ganglions nodosum der Ratte zeigten auch Kolokalisationen von NADPH-d/SP-Immunreaktivität (Aimi et al. 1991). Eine eindeutige Kolokalisation der beiden Mediatoren in den Neuronen der sensiblen Vagusganglien mit Projektion zu den unteren Atemwegen des Meerschweinchens wurde nicht gefunden (Fischer et al.1996b).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine NOS-und SP-positive neuronale Population, die die unteren Atemwege der Maus innervieren, nachgewiesen. Dazu wurde auch Kolokalisationen von NOS-/SP-Immunreaktivität in den Nervenfasern der unteren Atemwege der Maus gefunden. NO wird als Kandidat für den inhibitorischen NANC- und SP für excitatorische NANC-Effekte gehandelt. Das gemeinsame Vorkommen beider Mediatoren im gleichen Neuron des sensiblen Vagusganglions läßt auf eine Interaktion der durch diese beiden Neuropeptide vermittelten Mechanismen vermuten (Joad et al. 1997). Inwieweit die Funktionen von NO und SP dabei miteinander verknüpft sind, ist noch nicht bekannt und bedarf der weiteren Untersuchung.

NOS/SP-positive Neurone der sensiblen Vagusganglien sind auch an der Innervation anderer Organe beteiligt. NADPH-d/SP- und NOS/SP-haltige Neurone der Spinalganglien der Ratte und des Ganglions nodosum der Maus projizieren zum Ösophagus und Magen (Aimi et al. 1991, Sang et al.1998).

III. Retrograd markierte Neurone mit SP- /NOS+-Immunreaktivität.

Von den mit Fast Blue markierten Neuronen in den beiden vagalen Ganglien enthielten 14-15% NOS-positive/SP-negative Immunreaktivität. Die NOS-positiven/SP-negativen Nervenfasern in den Atemwegen der Maus können von diesen Ganglienzellen stammen. Durch retrograde neuronale Makierung wurde eine Projektion NOS-positiver, aber Tachykinin-negativer vagal-sensibler Neurone zu der Trachea des Meerschweinchens gezeigt (Fischer et al. 1996b). NOS-positive Nervenfasern bilden ein dichtes Geflecht in der Bronchialmuskulatur des Menschen und der Ratte (Kobzik et al.1993).

NOS-immunreaktive Perikaryen kommen sowohl in sensiblen als auch in sympathischen Ganglien des Meerschweinchens (Fischer et al. 1996b), in sympathischen und parasympathischen Ganglien der Ratte (Ceccatelli et al. 1994) und in sensiblen und parasympathischen Ganglien des Menschen vor (Fischer und Hoffmann 1996). NO kann als Co-Transmitter mit Nordrenalin und Acetylcholin von adrenergen und cholinergen Neuronen freigesetzt werden. Eine Interaktion zwischen NO und Noradrenalin im peripheren sympathischen und zentralen Nervensystem der Ratte wurde berichtet (Liu et al.1997, Schwarz et al.1995, Seilicovich et al.1995). Bisher ist es noch nicht gelungen, die Herkunft von NO aus Nerven zu bestimmen, da noch keine Methode existiert, die parasympathischen Nerven auszuschalten.

Nach den erzielten Ergebnissen der EFS und der Experimente mit Gabe von dem Substanزانalogon des L-Arginins N-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME), einem NO-Synthase-Inhibitor, wird NO als der bedeutendste bronchodilatatorische iNANC-Mediator in der menschlichen Bronchialmuskulatur (Ellis & Udem 1992) und in der glatten Muskulatur der Trachea des Meerschweinchens (Li et al.1991; Tucker et al.1990) angenommen. Den ersten Beweis für die Annahme der Existenz der i-NANC-Nerven beim Meerschweinchen (Coburn et al. 1973, Coleman et al. 1974) und beim Menschen (Richardson et al. 1976) lieferten die Studien mit EFS der glatten Trachealmuskulatur. Coburn und Tomita (1973) zeigten eine biphasische Antwort der EFS, welche aus einer initialen Kontraktion und anschließend einer Relaxation bestand. Die Bronchokonstriktion konnte mit Atropin aufgehoben werden, die darauffolgende Bronchodilatation wurde durch die Behandlung mit muskarinergen Rezeptoren- und nur wenig durch β -Blocker beeinflusst. Diese Studien lieferten den Beweis für die Annahme eines i-NANC-Mechanismus. Die Verteilung der Neuronen, die die i-NANC-Effekte vermitteln, wurde bisher noch nicht beschrieben und ist möglicherweise von Spezies zu Spezies verschieden.

Zunehmende Hinweise deuten sowohl auf einen positiven als auch negativen Effekt von endogen produzierten NO in Asthma (Barnes et al. 1996). Neuronale NOS (nNOS) wird in Neuronen und NOS in Endothelzellen (eNOS) der Atemwege synthetisiert (Kobzik et al. 1993) und ist an der physiologischen Regulation der Atemwege beteiligt. Induzierbare NOS wird in Epithelzellen und inflammatorischen Zellen der Atemwege exprimiert (Robbin et al. 1994, Guo et al.2000) und ist vielleicht verantwortlich für den pathologischen Effekt von NO in Asthma. Die Biopsie von Patienten mit Asthma bronchiale zeigte einen verstärkten Anstieg der i-NOS-Expression in Epithelzellen

(Hamid et al. 1993), es wurde eine erhöhte Konzentration von NO aus der Atemluft der Patienten mit Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis gefunden (Alving et al. 1993, Hanazawa et al. 2000, Kharitonow et al. 1994, 97, Silkoff et al. 2000a). Eine erhöhte NOS-Gen-Expression in den Lungengewebe der Brown-Norway Ratte nach der Sensibilisierung mit Ovaalbumin wurde gezeigt, und ein weiterer Anstieg der Gen-Expression 4 Stunden nach der inhalativen Provokation beobachtet (Liu et al. 1997). Weitere direkte oder indirekte Effekte von NO auf die Immunzellen wurden beschrieben (Trifilieff et al. 2000b). NO verhindert die Proliferation der T-Helfer-Zellen und deren Produktion von Interleukin 2 und Interferon γ (Taylor-Robin et al. 1994, 97, Xiong et al. 1999). Ein antinflammatorischer Effekt von NO durch Herunterregulation der proinflammatorischen Zytokine der Alveolarmakrophagen wurde beschrieben (Thomassen et al. 1997). Über eine Stimulierung der proinflammatorischen Zytokinen-Expression durch NO, die zur Einwanderung von Immunzellen in die Atemwege führte, wurde berichtet (Trifilieff et al. 2000b). NO spielt somit in der Physiologie und Pathophysiologie von Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale eine bedeutende Rolle. NO besitzt pro- und antinflammatorische Eigenschaften (Silkoff et al. 2000).

IV. Retrograd-markierte Neurone mit NOS-/SP--Immunreaktivität.

Mehr als 80% der Neurone der sensiblen Vagusganglien mit Projektion zu den unteren Atemwegen der Maus zeigten keine Immunreaktivität für NOS und SP. Immunreaktivität für anderen Neuromediatoren (Opoide) in diesen Ganglienzellen wurde nicht untersucht. Welche Mediatoren sie außer den klassischen Transmittern (Aspartat, Glutamat) enthalten, bleibt ungeklärt.

4.2.2 Sympathische Ganglien

Retrogrades neuronales Tracing kombiniert mit immunhistochemischer Analyse der zu den Atemwegen ziehenden Neurone in den sympathischen Ganglien (Ganglion cervicale superius und stellatum) wurde außer bei den Meerschweinchen (Kummer et al. 1992b), bei der Maus und anderen Spezies noch nicht untersucht. In Studien mit Immunhistochemie am Meerschweinchen konnten in sympathischen Ganglien (Ganglion cervicale superius und stellatum) TH-, NPY-, Dynorphin-, Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)-und CGRP-positive Neurone gefunden werden. In der selben Studie mit Doppelimmunhistochemie mit Antiseren gegen TH und NPY wurden

TH+/NPY+, TH+/NPY-, TH-/NPY+ Phänotypen von sympathischen Neuronen gefunden (nach der abnehmenden Anzahl aufgelistet). Nur eine sehr geringere Zahl von TH-negativen/NPY-positiven Neuronen wurden gefunden. Einige TH-positive Neurone enthielten zusätzlich Dynorphin-Immunreaktivität. Die TH- und VIP-Immunreaktivität zeigte eine komplementäre Verteilung, so daß ein sympathisches Neuron niemals TH und VIP-positiv sein kann (Kummer et al. 1992b). Es wurden auch NOS-positive Neurone, die zu der Trachea des Meerschweinchens ziehen, gefunden. Diese NOS-positiven Neurone sind meistens TH-negativ (Fischer et al. 1996b).

Teilaspekt dieser Arbeit waren die Korrelationsuntersuchungen der zu den unteren Atemwegen projizierenden Neurone in den sympathischen Ganglien (Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum). Es wurde hierbei für den indirekten immunhistochemischen Nachweis der Katecholamine ein spezifischer Antikörper gegen das Enzym Tyrosin Hydroxylase verwendet. Die Tyrosin Hydroxylase ist ein Schrittmacherenzym der Biosynthese der Katecholamine. Das Resultat dieser Untersuchung zeigte, daß alle möglichen Kombinationen der Korrelation von TH mit NPY in den zu den Atemwegen ziehenden Neuronen vorkommen kann: FB/TH+/NPY-(**I**), FB/TH+/NPY+(**II**), FB/TH-/NPY+(**III**), FB/TH-/NPY-(**IV**). Zu ähnlichen Ergebnissen kam man in der Tracing-Studie beim Meerschweinchen (Kummer et al. 1992b).

I. Retrograd-markierte Neurone mit TH+/NPY--Immunreaktivität.

Seit langem ist bekannt, daß die tracheobronchialen und pulmonaren Blutgefäße und exokrinen Drüsen der unteren Atemwege bei verschiedenen Spezies wie bei den Schafen, Schweinen, Kaninchen (Mann 1971), der Ratte, den Meerschweinchen, den Affen (Doidge und Satchell 1982) und Menschen (Pack und Richardson 1984, Partanen et al. 1982) von den sympathischen noradrenergen Nervenfasern innerviert werden. TH-positive/NPY-negative Nervenfasern wurden in dieser Arbeit rings um die Lungengefäße gefunden. Die in den sympathischen Ganglien gefundenen und zur Lunge ziehenden TH-positiven Neurone könnten Ursprung dieser sympathischen noradrenergen Nervenfasern sein. Sowohl in Ganglion cervicale superius als auch Ganglion stellatum enthielt der größte Teil (etwa 56%) der zu den Atemwegen projizierenden Neurone TH- und keine NPY-Immunreaktivität. In einer ähnlichen Studie am Meerschweinchen enthielten vergleichsweise weniger Neurone, die die

Trachea innervieren, TH und kein NPY. Es wurden bei den meisten zur Trachea ziehenden Neuronen eine Kolokalisation von TH und NPY gefunden (Kummer et al. 1992b).

In einer Rezeptor-Bindungs-Studie konnte eine hohe Dichte von β -Adrenozeptoren (β_2 häufiger als β_1) aber relativ wenig α -Rezeptor in den Lungengewebe vieler Spezies, einschließlich des Menschen, nachgewiesen werden (Barnes et al. 1979, 1980). Bei Stimulation der sympathischen Nerven wird Noradrenalin (NA) freigesetzt. NA vermittelt hauptsächlich über β_2 -Rezeptoren eine Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur und verursacht unter bestimmten Bedingungen, wie durch eine Vorbehandlung mit Propanol, Endotoxin und Histamin über α -Rezeptoren, eine Kontraktion der Bronchialmuskulatur (Simonsson et al. 1972, Kneussl et al. 1978).

II. Retrograd-markierte Neurone mit TH+/NPY+Immunreaktivität.

Viele zur Lunge projizierenden Neurone zeigten eine Koexistenz von TH und NPY. Bei der vorliegenden Untersuchung waren 43% (SCG) und 38% der zur Lunge ziehenden Neurone (Ganglion Stellatum) TH-/ NPY-positiv. TH-positive/ NPY-positive Nervenfasern wurden um die Lungengefäße der Maus gefunden. Kummer und Mitarbeiter (1992b) konnten in einem ähnlichem Versuch eine höhere Koexistenz der beiden Mediatoren in den zu der Trachea ziehenden Neuronen nachweisen. In einem Degenerationsexperiment mit dem noradrenergen Neurotoxin (6-Hydroxydopamin) führte zu einer Reduktion der Anzahl der NPY-positiven Nervenfasern der unteren Atemwege der Ratte und des Meerschweinchens (Uddman et al. 1984). Die Annahme für eine Koexistenz der beiden Mediatoren wurde durch dieses Ergebnis bestätigt. Außerdem ist bekannt, daß NPY der stärkste Vasokonstriktor ist und zusammen mit Noradrenalin den lokalen Blutfluß reguliert (Rudehill et al. 1987; Lundberg und Hökfelt 1986). NPY verursachte eine lang anhaltende Reduzierung des Blutflusses in der Trachea eines Hundes (Salonen et al. 1988). Zusammen mit Noradrenalin reduzierte NPY die mikrovaskuläre Extravasation durch Reduktion der Perfusion von permeablen postkapillären Venuolen (Boschetto et al. 1989).

III. Retrograd-markierte Neurone mit TH- /NPY+ Immunreaktivität.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Arbeit von Kummer und Mitarbeitern (1992b) mit Meerschweinchen wurde hier eine sehr kleine neuronale Population mit TH-negativer/NPY-positiver Immunreaktivität, die die unteren Atemwege der Maus innerviert, gefunden, welche zu der nicht-katecholaminergen Population gehörte. Wie in der Studie von Kummer und Mitarbeitern (1992b) wurden TH-negative/ NPY-positive Neurone, die zur Lunge ziehen, in dem Ganglion Stellatum (mit etwa 0,4%) häufiger als in dem oberen Cervicalganglion (mit etwa 0,2%) nachgewiesen. Fischer und Mitarbeiter (1996b) konnten in einer Tracing-Studie in sympathischen Ganglien NOS-positive Neurone, die die Trachea beim Meerschweinchen innervieren, nachweisen, die hauptsächlich TH-negativ waren. Ein kleine neurale Population mit TH-/NOS+Phänotyp wurde daher angenommen. Sympathische Ganglien wurden nicht auf NOS immunhistochemisch untersucht, es konnte in der vorliegenden Studie keine Aussage gemacht werden, ob die TH-negativen/NPY-positiven Neurone mit Projektion zu den unteren Atemwegen der Maus NOS-Immunreaktivität enthalten.

Das aus den Nerven freigesetzte Neuropeptid Y hat einen modulierenden Effekt auf die tachykininerge (e-NANC)- Bronchokonstriktion bei den Meerschweinchen in vitro und in vivo (Matran et al. 1989, Stretton et al. 1990). Diese Inhibition der e-NANC-Bronchokonstriktion durch NPY könnte den iNANC-Effekt unterstützen und zu einer verstärkten Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege der Maus führen.

IV. Retrograd-markierte Neurone mit TH- /NPY- -Immunreaktivität.

Diese kleine neuronale Population wurde häufiger in dem Ganglion Stellatum (6%) als in dem oberen Cervicalganglion (weniger als 1%) gefunden. Die Frage, was diese doppelt-negativen Neurone für Neuromediatoren enthalten können, bleibt offen und bedarf der weiteren Untersuchung.

Kummer (1992b) konnte immunhistochemisch nachweisen, daß TH-und VIP-Immunreaktivität der sympathischen Ganglienzellen eine komplementäre Verteilung zeigt, so daß ein sympathisches Neuron entweder TH- oder VIP-Immunreaktivität besitzt, aber niemals beide. Dieses würde bedeuten, daß alle TH-negativen sympathischen Neurone VIP-positiv sind. Alle sympathischen TH-negativen Neurone mit Projektion zu den Atemwegen des Meerschweinchens zeigten aber keine VIP-Immunreaktivität (Kummer et al.1992b). Andere Tracings-Studie zeigten VIP/NPY-

positive Neuronen, die zu den Atemwegen des Meerschweinchens ziehen, in Ganglion stellatum. Die Neuronen waren negativ für TH-IR und gehören wahrscheinlich zu den non-noradrenergen neuronalen Populationen (Bowden und Gibbins, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden die sympathischen Ganglienzellen auf VIP-Immunreaktivität nicht untersucht. In vielen Studien konnte eine durch VIP vermittelte NANC-Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege bei verschiedenen Spezies nachgewiesen werden (Matsuzaki et al. 1980; Li et al. 1991, Takahashi et al. 1995). Die direkte Wirkung der VIP-immunreaktiven Neurone könnte über eine Aktivierung der Adenylatzyklase (VIP) zu inhibitorischen NANC-Effekten in den Atemwegen führen. Die Herkunft von VIP bleibt in dieser Studie ungeklärt.

4.3. Korrelation von SP mit NOS bzw. von TH mit NPY in den zu unteren Atemwegen projizierenden Nervenfasern

4.3.1 Korrelation von SP mit NOS

Nervenfasern mit NOS- und SP-Immunreaktivität liegen eng benachbart und ziehen als Nervenbündel zu der glatten Muskulatur des Bronchus und der Gefäße. Oft ist es schwierig eine Aussage bezüglich der Kolokalisation von NOS- und SP-Immunreaktivität in den Nervenfasern zu treffen. Die SP-immunreaktive (oft kolokalisiert mit CGRP) Nervenfasern stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit von den sensiblen Ganglienzellen des Ganglions jugulare und präsentieren die unmyelinisierte, Capsaicin-sensitive C-Fasern (Cadieux et al. 1986, Hua et al. 1985, Lundberg et al. 1984, 85, Nishi et al. 2000, Ricco et al. 1996).

Infolge des inflammatorischen Geschehens wurden eine Zunahme der Nervenfaserdichte und eine Erhöhung der Produktion von SP und CGRP in sensiblen Neuronen beobachtet (Galeazza et al. 1995, Fujishima et al. 1997). Von einer Reinnervation der Nervenfasern mit CGRP-Immunreaktivität nach der Denervation infolge einer orthotopen Lungentransplantation bei der Ratte wurden bei einigen Studien berichtet. Bei der Lungentransplantation wird die Innervation der Lunge unterbrochen. Die Nervenfasern mit ihren Zellkörpern würden zugrunde gehen. Ein Monat nach der Lungentransplantation bei der Ratte wurden immunhistochemisch SP-/CGRP-positive Nervenfasern in der transplantierten Lunge nachgewiesen (Kawaguchi et al. 1998, Buvry et al. 1999). Diese Nervenfasern können aber auch intrinsischer

Ursprung sein. Als Folge der Denervierung kann es zur Plastizität der Mediatoren in parasymphatischen (intrinsischen) Neurone kommen (Fontan et al. 2000a).

Ursprungsstätte der NOS-immunreaktiven Nervenfasern in den unteren Atemwegen der Maus könnten Neurone in den sensiblen Vagusganglien (jugulare und nodosum) sein, da NOS-positive Ganglienzellen mit Projektion zu den unteren Atemwegen der Maus in beiden sensiblen Vagusganglien gefunden wurden. NOS-immunreaktive Neurone in sympathischen Ganglien (Ganglion stellatum) mit Projektion zur Trachea des Meerschweinchens wurde nachgewiesen (Fischer et al. 1996b). Eine andere Quelle für NOS-immunreaktive Nervenfasern beim Menschen könnten auch die lokalen (parasymphatischen) Neurone sein (Fischer et al. 1996a). Bei den Menschen zeigten etwa zwei Drittel der lokalen Neurone NOS-Immunreaktivität (Fischer and Hoffmann 1996). Ein sympathischer und parasymphatischer Ursprung kann daher nicht ausgeschlossen werden. Eine Koloaliation von NOS- und SP-Immunreaktivität in den Nervenfasern der Maus konnte gezeigt werden. Ursprungsstätte dieser Nervenfasern könnten die retrograd-markierten NOS-/SP-positiven Neurone in sensiblen Vagusganglien sein.

4.3.2. Korrelation von TH mit NPY

Bei der Maus wurden alle möglichen Kombinationen von TH-/NPY-Immunreaktivität in den Nervenfasern der unteren Atemwege beobachtet. Als Ursprungsstätte der TH- und NPY-positiven Nervenfasern wurde bei der Maus das Ganglion cervicale superius und Stellatum angenommen. Kummer und Mitarbeiter (1992b) kamen für das Meerschweinchen zu ähnlichen Ergebnissen. Diese Nervenfasern waren perivaskulär und entlang der glatten Muskulatur der Trachea und des Bronchus lokalisiert.

TH-immunreaktive Nervenfasern wurden in der Gefäßmuskulatur der unteren Atemwege der Maus beobachtet. Die Neurone dieser Nervenfasern liegen in den sympathischen Ganglien. Ein parasymphatischer Ursprung der Nervenfasern kann aber nicht ausgeschlossen werden, da auch TH-positive Neurone in den lokalen Ganglien gefunden wurden (Kummer et al. 1992b).

NPY-positive Nervenfasern in bronchialen Biopsien bei Gesunden und Asthma-Patienten wurden unterhalb des Epithels, an der glatten trachealen und bronchialen Muskulatur, der Drüsen und der Blutgefäße nachgewiesen (Lundberg et al. 1982). Wie beim Meerschweinchen konnte in der vorliegenden Arbeit bei der Maus NPY-positive Nervenfasern auch zahlreich rings um die Blutgefäße und Bronchien nachgewiesen

werden (Kummer et al.1992b). Die Herkunft dieser TH-negativen/NPY-positiven Nervenfasern stammt wahrscheinlich aus der kleinen neuronalen TH-negativen/NPY-positiven Population der sympathischen Ganglien (Kummer et al. 1992b).

5. Zusammenfassung

Das Interesse an der Maus als Allergie-Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie der Atemwegserkrankungen wie Asthma oder Atemwegshyperreaktivität ist in den letzten Jahren, insbesondere durch die Möglichkeit der Verwendung von genetisch-veränderten Mäusen, stetig gestiegen. Eine detaillierte topographische und neurochemische Kartierung der sensiblen und sympathischen Innervation der unteren Atemwege der Maus wurde bisher noch nicht durchgeführt.

Diese Arbeit trägt einen Teil zur topographischen und neurochemischen Kartierung von sensibler und sympathischer Innervation der unteren Atemwege der Maus bei. Die sympathische und sensible Innervation der Lunge der Maus wurde mittels retrograder neuronaler Markierung kombiniert mit Doppelimmunhistochemie untersucht. Es wurde ein Farbstoff Fast Blue in den rechten Hauptbronchus der Maus injiziert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse ausgewertet.

Sympathische Neurone mit Projektion zu den unteren Atemwegen der Maus waren sowohl im Ganglion cervicale superius als auch im Ganglion stellatum lokalisiert. Retrograd-markierte sympathische Neurone waren gewöhnlich immunreaktiv für Tyrosin-Hydroxylase, ein größter Teil enthielt zusätzlich das Neuropeptid Y-Immunreaktivität, ein sehr kleiner Teil der Neurone gehört zu der nicht-katecholaminergen neuronalen Population (negativ für Tyrosin Hydroxylase), aber sie zeigte NPY-Immunreaktivität. Ein kleiner Teil der retrograd-markierten Neurone war weder immunreaktiv für Tyrosin-Hydroxylase noch für Neuropeptid Y. Zu allen möglichen Kombinationen der Korrelation von TH mit NPY wurden auch entsprechende Muster der Korrelation in den Nervenfasern der unteren Atemwege der Maus gefunden.

Sensible Neurone mit Projektion zu den unteren Atemwegen der Maus waren in den sensiblen Vagusganglien, im Ganglion jugulare und Ganglion nodosum lokalisiert. Die retrograd-markierten Neurone zeigten alle möglichen Kombinationen der Korrelation von NOS mit SP, etwa 15% der retrograd-markierten Neurone war immunreaktiv für NOS, kleine neuronale Population zeigte NOS-/SP-Immunreaktivität, etwa eine gleiche Anzahl war nur SP-positiv. Entsprechende Muster der Korrelation von NOS und SP in den Nervenfasern der Lunge der Maus wurden gefunden.

Mittels retrograder neuronaler Markierungen konnte der vagal-sensible und sympathische Ursprung der zu den unteren Atemwegen projizierenden Nervenfasern der Maus bestimmt werden. Die Perikaryen der sensiblen Nervenfasern der Atemwegen der

Maus wurden im Ganglion jugulare/nodosum, die der postganglionären sympathischen Nervenfasern im Ganglion SCG und stellatum identifiziert.

Die quantitative Analyse der markierten Neuronen zeigte sowohl für die vagal-sensible als auch für die sympathische Innervation der rechten Lunge der Maus eine bilaterale Beteiligung von rechts als auch links. Mit der quantitativen Immunhistochemie in Kombination mit der Tracings-Technik wurde der Anteil der wichtigsten Mediatoren der sensiblen (SP, NOS) und sympathischen (TH, NPY) Atemwegsinnervation der Maus bestimmt

Diese Daten sind bedeutsam für das Verständnis der Regulation der Lunge unter normalen Bedingungen und dienen als Basis für die Erforschung der Pathogenese des Asthma bronchiale.

6. Literaturverzeichnis

Adrian, T. E., J. M. Allen, S. R. Bloom, M. A. Ghatei, M. N. Rossor, G. W. Roberts, T. J. Crow, K. Tatemoto, and J. M. Polak. 1983. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306(5943):584-6.

Aimi, Y., M. Fujimura, S. R. Vincent, and H. Kimura. 1991. Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J Comp Neurol* 306(3):382-92.

Aizawa, H., Y. Matsuzaki, M. Ishibashi, M. Domae, T. Hirose, N. Shigematsu, and K. Tanaka. 1982. A possible role of a nonadrenergic inhibitory nervous system in airway hyperreactivity. *Respir Physiol* 50(2):187-96.

Allen, J. M., T. E. Adrian, K. Tatemoto, J. M. Polak, J. Hughes, and S. R. Bloom. 1982. Two novel related peptides, neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) inhibit the contraction of the electrically stimulated mouse vas deferens. *Neuropeptides* 3(2):71-7.

Allen, J. M., S. J. Gibson, T. E. Adrian, J. M. Polak, and S. R. Bloom. 1984. Neuropeptide Y in human spinal cord. *Brain Res* 308(1):145-8.

Alving, K., E. Weitzberg, J. M. Lundberg (1993). Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir. J* 6 1368-1370

Andersson, R. G., and N. Grundstrom. 1987. Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms. *Pharmacol Ther* 32(2):107-30.

Bacci, S., R. Arbi-Riccardi, B. Mayer, C. Rumio, and M. B. Borghi-Cirri. 1994. Localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in mast cells of human nasal mucosa. *Histochemistry* 102(2):89-92.

Baluk, P., and G. Gabella. 1987. Fine structure of the autonomic ganglia of the mouse pulmonary vein. *J Neurocytol* 16(2):169-84.

- Baluk, P., J. A. Nadel, and D. M. McDonald. 1992. Substance P-immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: a quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation. *J Comp Neurol* 319(4):586-98.
- Barnes, P. J., J. Kaliner, C. Hamilton, and C.T. Dollery. 1979. Demonstration of alpha-1-adrenoceptors in guinea pig lung using (H)prazosin. *Life Sci.* 25,1207-1214.
- Barnes, P. J., J. Kaliner, and C.T. Dollery. 1980. Human lung adrenoceptors studied by radioligand binding. *Clin.Sci.* 58:457-461
- Barnes, P. J. 1986. Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1(8475):242-5.
- Barnes, P. J. 1996. NO or no NO in asthma? *Thorax* 51(2):218-20.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, and B. A. Freeman. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4):1620-4.
- Belvisi, M. G., C. D. Stretton, M. Yacoub, and P. J. Barnes. 1992. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 210(2):221-2.
- Belvisi, M. G., M. Miura, D. Stretton, and P. J. Barnes. 1993. Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol* 231(1):97-102.
- Bing, C., P. King, L. Pickavance, M. Brown, D. Ziegler, E. Kaan, and G. Williams. 1999. The effect of moxonidine on feeding and body fat in obese Zucker rats: role of hypothalamic NPY neurones. *Br J Pharmacol* 127(1):35-42.
- Blottner, D., and H. G. Baumgarten. 1992. Nitric oxide synthetase (NOS)-containing sympathoadrenal cholinergic neurons of the rat IML-cell column: evidence from histochemistry, immunohistochemistry, and retrograde labeling. *J Comp Neurol* 316(1):45-55.

Boichot E., V. Lagente, M.Paubertbraquet, and N. Frossard. Inhaled substance-P induces activation of alveolar macrophages and increases airway responses in the guinea pig. *Neuropeptides* 1993 25:307-313.

Boschetto, P., N. M. Roberts, D. F. Rogers, and P. J. Barnes. 1989. Effect of antiasthma drugs on microvascular leakage in guinea pig airways. *Am Rev Respir Dis* 139(2):416-21.

Bowden, J. J., and I. L. Gibbins. 1992. Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y coexist in non-noradrenergic sympathetic neurons to guinea pig trachea. *J Auton Nerv Syst* 38(1):1-19.

Bredt, D. S., P. M. Hwang, and S. H. Snyder. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347(6295):768-70.

Buvry, A., Y. R. Yang, R. Tavakoli, and N. Frossard. 1999. Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and neuroendocrine cells after lung transplantation in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(6):1268-73.

Cadieux, A., D. R. Springall, P. K. Mulderry, J. Rodrigo, M. A. Ghatei, G. Terenghi, S. R. Bloom, and J. M. Polak. 1986. Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations. *Neuroscience* 19(2):605-27.

Canning B.J., and B.J. Udem. 1993. Evidence that distinct neural pathways mediate parasympathetic contraction and relaxations of the guinea-pig trachealis. *J Physiol (Lond)* 471:25-40

Canning B.J., and A. Fischer. 1997. Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea-pigs using Antisera to choline acetyltransferase. *Am J Physiol* 272:L731-L738.

Canning B.J., A. Fischer and B.J. Udem. 1997. Pharmacological Analysis of the Tachykinin Receptors that Mediate Activation of Noncholinergic Relaxant Nerves that Innervate Guinea Pig Trachealis. *The J of Pharmacology and Eperimental Therapeutics* 284:370-377.

Ceccatelli, S., J. M. Lundberg, X. Zhang, K. Aman, and T. Hokfelt. 1994. Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system. *Brain Res* 656(2):381-95.

Chan-Palay, V., Y. S. Allen, W. Lang, U. Haesler, and J. M. Polak. 1985. Cytology and distribution in normal human cerebral cortex of neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y. *J Comp Neurol* 238(4):382-9.

Chang, M. M., S. E. Leeman, and H. D. Niall. 1971. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* 232(29):86-7.

Cheung, A., J. M. Polak, F. E. Bauer, A. Cadieux, N. D. Christofides, D. R. Springall, and S. R. Bloom. 1985. Distribution of galanin immunoreactivity in the respiratory tract of pig, guinea pig, rat, and dog. *Thorax* 40(12):889-96.

Coburn, R. F., and T. Tomita. 1973. Evidence for nonadrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. *Am J Physiol* 224(5):1072-80.

Coburn, R. F. 1987. Peripheral airway ganglia. *Annu Rev Physiol* 49:573-82.

Coleman, R. A., and G. P. Levy. 1974. A non-adrenergic inhibitory nervous pathway in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 52(2):167-74.

Coleridge, J. C., and H. M. Coleridge. 1984. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99:1-110.

Dalsgaard, C. J., and J. M. Lundberg. 1984. Evidence for a spinal afferent

innervation of the guinea pig lower respiratory tract as studied by the horseradish peroxidase technique. *Neurosci Lett* 45(2):117-22.

Dalsgaard C.J. 1988. The sensory system. In: Björklund A., Hökfelt T., Owman C (Hrsg) Handbook of chemical neuroanatomie, *Elsevier, Amsterdam* Bd.6: 599-636.

Dawbarn, D., S. P. Hunt, and P. C. Emson. 1984. Neuropeptide Y: regional distribution chromatographic characterization and immunohistochemical demonstration in post-mortem human brain. *Brain Res* 296(1):168-73.

Dawson, T. M., D. S. Brecht, M. Fotuhi, P. M. Hwang, and S. H. Snyder. 1991. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17):7797-801.

Dawson, V. L., H. P. Brahmabhatt, J. A. Mong, and T. M. Dawson. 1994. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures. *Neuropharmacology* 33(11):1425-30.

de Rada, O. D., A. C. Villaro, L. M. Montuenga, A. Martinez, D. R. Springall, and J. M. Polak. 1993. Nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in human and porcine respiratory tract. *Neurosci Lett* 162(1-2):121-4.

Dey, R. D., W. A. Shannon, Jr., and S. I. Said. 1981. Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects. *Cell Tissue Res* 220(2):231-8.

Dey, R. D., J. Hoffpauir, and S. I. Said. 1988. Co-localization of vasoactive intestinal peptide- and substance P-containing nerves in cat bronchi. *Neuroscience* 24(1):275-81.

Dey, R. D., J. B. Altemus, I. Zervos, and J. Hoffpauir. 1990. Origin and colocalization of CGRP- and SP-reactive nerves in cat airway epithelium. *J Appl Physiol* 68(2):770-8.

Dey, R. D., B. Mayer, and S. I. Said. 1993. Colocalization of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase in neurons of the ferret trachea. *Neuroscience* 54(4):839-43.

Di Maria, G. U., L. Spicuzza, A. Mistretta, and G. Mazzeola. 2000. Role of endogenous nitric oxide in asthma [In Process Citation]. *Allergy* 55(Suppl 61):31-5.

Doidge, J. M., and D. G. Satchell. 1982. Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways. *J Auton Nerv Syst* 5(2):83-99.

Ellis, J. L., and B. J. Udem. 1992. Inhibition by L-NG-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airway. *Am Rev Respir Dis* 146(6):1543-7.

Euler, U. S. and J. H. Gaddum. 1931. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol* 72:74-87

Fischer, A., W. Kummer, J. Y. Couraud, D. Adler, D. Branscheid, and C. Heym. 1992. Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea. *Lab Invest* 67(3):387-93.

Fischer, A., P. Mundel, B. Mayer, U. Preissler, B. Philippin, and W. Kummer. 1993a. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci Lett* 149(2):157-60.

Fischer A, B. Hoffmann, C. Hauser-Kronberger, B. Mayer, and W. Kummer. 1993b. Nitric oxide synthase in the innervation of the human respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 147, A622 (Abstract).

Fischer, A., B. J. Canning, and W. Kummer. 1996a. Correlation of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase with choline acetyltransferase in the airway innervation. *Ann N Y Acad Sci* 805:717-22.

Fischer, A., B. Mayer, and W. Kummer. 1996b. Nitric oxide synthase in vagal sensory and sympathetic neurons innervating the guinea-pig trachea. *J Auton Nerv Syst* 56(3):157-60.

Fischer, A., and B. Hoffmann. 1996. Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am J Respir Crit Care Med* 154(1):209-16.

Fischer, A., B. J. Canning, B. J. Udem, and W. Kummer. 1998. Evidence for an esophageal origin of VIP-IR and NO synthase-IR nerves innervating the guinea pig trachealis: a retrograde neuronal tracing and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 394(3):326-34.

Fontan, J. J., D. N. Cortright, J. E. Krause, C. R. Velloff, V. V. Karpitskyi, T. W. Carver, Jr., S. D. Shapiro, and B. N. Mora. 2000a. Substance P and neurokinin-1 receptor expression by intrinsic airway neurons in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(2):L344-55.

Fontan, J. J., C. T. Diec, and C. R. Velloff. 2000b. Bilateral distribution of vagal motor and sensory nerve fibers in the rat's lungs and airways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(2):R713-28.

Freedman, J. E., R. Sauter, E. M. Battinelli, K. Ault, C. Knowles, P. L. Huang, and J. Loscalzo. 1999. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 84(12):1416-21.

Fujishima, H., M. Takeyama, T. Takeuchi, I. Saito, and K. Tsubota. 1997. Elevated levels of substance P in tears of patients with allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 27(4):372-8.

Furness, J. B., M. Costa, P. C. Emson, R. Hakanson, E. Moghimzadeh, F. Sundler, I. L. Taylor, and R. E. Chance. 1983. Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea-pig digestive tract. *Cell Tissue Res* 234(1):71-92.

Galeazza, M. T., M. G. Garry, H. J. Yost, K. A. Strait, K. M. Hargreaves, and V. S. Seybold. 1995. Plasticity in the synthesis and storage of substance P and calcitonin gene-related peptide in primary afferent neurons during peripheral inflammation. *Neuroscience* 66(2):443-58.

Goto E, H. Kohrogi, N. Hirata, K.Tsumori, S. Hirosako, J. Hamamoto, K. Fujii, O. Kawano, and M. Ando. 2000a. Human bronchial intraepithelial T lymphocytes as a distinct T-cell subset: their long-term survival in SCID-Hu chimeras. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 405-411.

Guo, F. H., S. A. Comhair, S. Zheng, R. A. Dweik, N. T. Eissa, M. J. Thomassen, W. Calhoun, and S. C. Erzurum. 2000b. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol* 164(11):5970-80.

Hamid, Q., D. R. Springall, V. Riveros-Moreno, P. Chanez, P. Howarth, A. Redington, J. Bousquet, P. Godard, S. Holgate, and J. M. Polak. 1993. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 342(8886-8887):1510-3.

Hanazawa, T., J. D. Antuni, S. A. Kharitonov, and P. J. Barnes. 2000. Intranasal administration of eotaxin increases nasal eosinophils and nitric oxide in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 105(1 Pt 1):58-64.

Harmar, A. J., V. Hyde, and K. Chapman. 1990. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett* 275(1-2):22-4.

Helke, C. J., J. E. Krause, P. W. Mantyh, R. Couture, and M. J. Bannon. 1990. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *Faseb J* 4(6):1606-15.

Honjin R. 1954. On the ganglia and nerves of the lower respiratory tract of the mouse. *J Morphol* 95:263-288.

- Honjin R. 1956. On the nerve supply of the lung of the mouse, with special reference to the structure of the peripheral vegetative nervous system. *J Comp Neurol* 105:587-625.
- Hope, B. T., G. J. Michael, K. M. Knigge, and S. R. Vincent. 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7):2811-4.
- Hoyle, G. W., R. M. Graham, J. B. Finkelstein, K. P. Nguyen, D. Gozal, and M. Friedman. 1998. Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(2):149-57.
- Hua, X. Y., E. Theodorsson-Norheim, E. Brodin, J. M. Lundberg, and T. Hokfelt. 1985. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept* 13(1):1-19.
- Hunter, D.D., A.C. Meyer, B.J.Udem. 2000. Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1985-1990
- Ignarro, L. J. 1992. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans* 20(2):465-9.
- Iwamoto I., N. Nakagawa, H.Yamazaki, A Kimura, H. Tomioka, and S.Yoshida. Mechanism for substance-P-induced activation of human neutrophils and eosinophils. *Regul Pept* 1993 46:228-330.
- Jafarian, A., M. R. Suresh, F. T. Kreutz, and D. F. Biggs. 1995. Passive immunization with an anti-substance P antibody prevents substance P- and neurokinin A-induced bronchospasm in anesthetized guinea-pigs. *Life Sci* 57(2):143-53.
- Joad, J. P., K. S. Kott, and A. C. Bonham. 1997. Nitric oxide contributes to substance P-induced increases in lung rapidly adapting receptor activity in guinea-pigs. *J Physiol (Lond)* 503(Pt 3):635-43.

Joos, G. F., P. R. Germonpre, and R. A. Pauwels. 2000a. Review article. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 2000. 55:321-337.

Joos, G. F., P. R. Germonpre, and R. A. Pauwels. 2000b. Neural mechanisms in asthma. *Clin Exp Allergy* 30(Suppl 1):60-5.

Kage, R., G. P. McGregor, L. Thim, and J. M. Conlon. 1988. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem* 50(5):1412-7.

Kalia, M., and M. M. Mesulam. 1980. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol* 193(2):435-65.

Karlsson, J. A., M. J. Finney, C. G. Persson, and C. Post. 1984. Substance P antagonists and the role of tachykinins in non-cholinergic bronchoconstriction. *Life Sci* 35(26):2681-91.

Kawaguchi, A. T., M. Shirai, M. Yamano, H. Ishibashi-Ueda, A. Yamatodani, and Y. Kawashima. 1998. Afferent reinnervation after lung transplantation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 17(4):341-8.

Kharitonov, S. A., D. Yates, R. A. Robbins, R. Logan-Sinclair, E. A. Shinebourne, and P. J. Barnes. 1994. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343(8890):133-5.

Kharitonov, S. A., K. Rajakulasingam, B. O'Connor, S. R. Durham, and P. J. Barnes. 1997. Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 99(1 Pt 1):58-64.

Kneussl M. P., and J. P. Richardson. 1978. Alpha-adrenergic receptors in human and canine tracheal and bronchial smooth muscle. *J Appl Physiol* 39:37-40.

Kobzik, L., D. S. Bredt, C. J. Lowenstein, J. Drazen, B. Gaston, D. Sugarbaker, and J. S. Stamler. 1993. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9(4):371-7.

Kotani, Y., Y. Hirota, K. Sugiyama, S. Joh, T. Shibutani, H. Matsuura, and R. Inoki. 1986. Effects of noxious stimuli and anesthetic agents on substance P content in rat central nervous system. *Jpn J Pharmacol* 40(1):143-7.

Köhler, C., L.Eriksson, S. Davies, and V. Chan-Palay. 1986. Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. *J Comp Neurol* 244:384-400

Kummer, W. 1988. Retrograde neuronal labelling and double-staining immunohistochemistry of tachykinin- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive pathways in the carotid sinus nerve of the guinea pig. *J Auton Nerv Syst* 23(2):131-41.

Kummer, W., A. Fischer, P. Mundel, B. Mayer, B. Hoba, B. Philippin, and U. Preissler. 1992a. Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport* 3(7):653-5.

Kummer, W., A. Fischer, R. Kurkowski, and C. Heym. 1992b. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49(3):715-37.

Kummer W., R. Haberberger, and A. Fischer. 2000. Choline acetyltransferase in the airway wall. *Eur Respir Rev* 2000, 10:73, 257-259.

Kuo, H. P., J. A. Rohde, K. Tokuyama, P. J. Barnes, and D. F. Rogers. 1990. Capsaicin and sensory neuropeptide stimulation of goblet cell secretion in guinea-pig trachea. *J Physiol (Lond)* 431:629-41.

- Laitinen, A. 1985. Autonomic innervation of the human respiratory tract as revealed by histochemical and ultrastructural methods. *Eur J Respir Dis Suppl* 140:1-42.
- Levine, J. D., D. H. Collier, A. I. Basbaum, M. A. Moskowitz, and C. A. Helms. 1985. Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 135(2 Suppl):843s-847s.
- Levine, J. D., H. L. Fields, and A. I. Basbaum. 1993. Peptides and the primary afferent nociceptor. *Neuroscience* 55(4):1037-43.
- Li C.G., and M.J.Rand.1991. Evidence that part of the NANC relaxant respons of the guinea-pig trachea to EFS is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 102:91-94
- Lindh, B., W. Staines, T. Hokfelt, L. Terenius, and P. M. Salvaterra. 1986. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14):5316-20.
- Lindsay, R. M., and A. J. Harmar. 1989. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337(6205):362-4.
- Lipscomb M. F.,and J. A. Wilder. 1999. Immune dysregulation as a cause for allergic asthma. *Curr Opin Pulm Med* 5:10-20.
- Liu, S. F., E. B. Haddad, I. Adcock, M. Salmon, H. Koto, T. Gilbey, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1997. Inducible nitric oxide synthase after sensitization and allergen challenge of Brown Norway rat lung. *Br J Pharmacol* 121(7):1241-6.
- Lopez-Costa, J. J., J. Goldstein, and J. P. Saavedra. 1997. Neuronal and macrophagic nitric oxide synthase isoforms distribution in normal rat retina. *Neurosci Lett* 232(3):155-8.
- Lulich, K. M., H. W. Mitchell, and M. P. Sparrow. 1976. The cat lung strip as an in vitro preparation of peripheral airways: a comparison of beta-adrenoceptor agonists, autacoids and anaphylactic challenge on the lung strip and trachea. *Br J Pharmacol* 58(1):71-9.

Lundberg, J. M., L. Terenius, T. Hokfelt, C. R. Martling, K. Tatemoto, V. Mutt, J. Polak, S. Bloom, and M. Goldstein. 1982. Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 116(4):477-80.

Lundberg, J. M., L. Terenius, T. Hokfelt, and M. Goldstein. 1983. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett* 42(2):167-72.

Lundberg, J. M., C. R. Martling, A. Saria, K. Folkers, and S. Rosell. 1983. Cigarette smoke-induced airway oedema due to activation of capsaicin-sensitive vagal afferents and substance P release. *Neuroscience* 10(4):1361-8.

Lundberg, J. M., T. Hokfelt, C. R. Martling, A. Saria, and C. Cuello. 1984. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res* 235(2):251-61.

Lundberg, J. M., A. Franco-Cereceda, X. Hua, T. Hokfelt, and J. A. Fischer. 1985. Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur J Pharmacol* 108(3):315-9.

Lundberg, J. M., A. Hemsén, O. Larsson, A. Rudehill, A. Saria, and B. B. Fredholm. 1988. Neuropeptide Y receptor in pig spleen: binding characteristics, reduction of cyclic AMP formation and calcium antagonist inhibition of vasoconstriction. *Regul Pept* 20(2):125-39.

Lundberg, J. M., and A. Modlin. 1994. Neuropeptide Y in the airways. In M.A. Kaliner, P. J. Barnes, G.H.H. Kunkel, and J. N. Baraniuk, editors. *Neuropeptides in Respiratory Medicine*. Marcel Dekker, New York. 161-172.

Maggi C.A., A. Giachetti, R.D. Dey, and S. I. Said. 1995. Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal Peptide and the tachykinins. *Physiol Review* 75:277-322.

Mann, S. P. 1971. The innervation of mammalian bronchial smooth muscle: the localization of catecholamines and cholinesterases. *Histochem J* 3(5):319-31.

Mantyh, C. R., T. S. Gates, R. P. Zimmerman, M. L. Welton, E. P. Passaro, Jr., S. R. Vigna, J. E. Maggio, L. Kruger, and P. W. Mantyh. 1988. Receptor binding sites for substance P, but not substance K or neuromedin K, are expressed in high concentrations by arterioles, venules, and lymph nodules in surgical specimens obtained from patients with ulcerative colitis and Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(9):3235-9.

Mapp, P. I., G. Terenghi, D. A. Walsh, S. T. Chen, S. C. Cruwys, N. Garrett, B. L. Kidd, J. M. Polak, and D. R. Blake. 1993. Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neuroscience* 57(4):1091-6.

Martling, C. R., E. Theodorsson-Norheim, and J. M. Lundberg. 1987. Occurrence and effects of multiple tachykinins; substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336(2):183-9.

Martling, C. R., A. Saria, J. A. Fischer, T. Hokfelt, and J. M. Lundberg. 1988. Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul Pept* 20(2):125-39.

Matran, R., C. R. Martling, and J. M. Lundberg. 1989. Inhibition of cholinergic and non-adrenergic, non-cholinergic bronchoconstriction in the guinea pig mediated by neuropeptide Y and alpha 2-adrenoceptors and opiate receptors. *Eur J Pharmacol* 163(1):15-23.

Matsuse, T., R. J. Thomson, X. R. Chen, H. Salari, and R. R. Schellenberg. 1991. Capsaicin inhibits airway hyperresponsiveness but not lipoxygenase activity or

eosinophilia after repeated aerosolized antigen in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 144(2):368-72.

Matsuzaki, Y., Y. Hamasaki, and S. I. Said. 1980. Vasoactive intestinal peptide: a possible transmitter of nonadrenergic relaxation of guinea pig airways. *Science* 210(4475):1252-3.

McCormack, D. G., R. O. Salonen, and P. J. Barnes. 1989. Effect of sensory neuropeptides on canine bronchial and pulmonary vessels in vitro. *Life Sci* 45(25):2405-12.

Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38(11):1709-15.

Morikawa, A., Y. Kato, T. Sugiyama, N. Koide, D. Chakravorty, T. Yoshida, and T. Yokochi. 1999. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in D-galactosamine-sensitized mice as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun* 67(3):1018-24.

Mundel, P., S. Bachmann, M. Bader, A. Fischer, W. Kummer, B. Mayer, and W. Kriz. 1992. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int.* Vol. 42, pp 1017-1019.

Nawa, H., T. Hirose, H. Takashima, S. Inayama, and S. Nakanishi. 1983. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature* 306(5938):32-6.

Nishi, Y., N. Kitamura, M. Otani, E. Hondo, K. Taguchi, and J. Yamada. 2000. Distribution of capsaicin-sensitive substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in bovine respiratory tract. *Anat Anz* 182(4):319-26.

Nohr, D., L. E. Eiden, and E. Weihe. 1995. Coexpression of vasoactive intestinal peptide, calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in parasympathetic neurons of the rhesus monkey lung. *Neurosci Lett* 199(1):25-8.

Pack, R. J., and P. S. Richardson. 1984. The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. *J Anat* 138(Pt 3):493-502.

Pack, R. J., L. H. Al-Ugaily, and J.G. Widdicombe. 1984. The innervation of the trachea and extrapulmonary bronchi of the mouse. *Cell Tissue Res* 238:61-68.

Padmaja, S., and R. E. Huie. 1993. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 195(2):539-44.

Partanen, M., A. Laitinen, A. Hervonen, M. Toivanen, and L. A. Laitinen. 1982. Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry* 76(2):175-88.

Rand, M. J. 1992. Nitrenergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19(3):147-69.

Rapoport, R. M., and F. Murad. 1983. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 9(4-5):281-96.

Ricco, M. M., W. Kummer, B. Biglari, A. C. Myers, and B. J. Udem. 1996. Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. *J Physiol (Lond)* 496(Pt 2):521-30.

Richardson, J., and J. Beland. 1976. Nonadrenergic inhibitory nervous system in human airways. *J Appl Physiol* 41(5 Pt. 1):764-71.

Robbins, R. A., P. J. Barnes, D. R. Springall, J. B. Warren, O. J. Kwon, L. D. Buttery, A. J. Wilson, D. A. Geller, and J. M. Polak. 1994. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 203(1):209-18.

Robbins, R. A., D. R. Springall, J. B. Warren, O. J. Kwon, L. D. Buttery, A. J. Wilson, I. M. Adcock, V. Riveros-Moreno, S. Moncada, J. Polak, and et al. 1994. Inducible

nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 198(3):835-43.

Rudehill, A., M. Olcen, A. Sollevi, B. Hamberger, and J. M. Lundberg. 1987. Release of neuropeptide Y upon haemorrhagic hypovolaemia in relation to vasoconstrictor effects in the pig. *Acta Physiol Scand* 131(4):517-23.

Salonen, R. O., S. E. Webber, and J. G. Widdicombe. 1988. Effects of neuropeptides and capsaicin on the canine tracheal vasculature in vivo. *Br J Pharmacol* 95(4):1262-70.

Sang, Q., and H. M. Young. 1998. The origin and development of the vagal and spinal innervation of the external muscle of the mouse esophagus. *Brain Res* 809(2):253-68.

Saria, A., J. M. Lundberg, G. Skofitsch, and F. Lembeck. 1983. Vascular protein linkage in various tissue induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 324(3):212-8.

Saria, A., C. R. Martling, Z Yan, E.Theodorsson-Norheim, R Gamse and J. M. Lundberg. 1988. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am Rev Respir Dis* 137:1330-5.

Simonsson B. G., N. Swedmyr, B. E. Skoogh, R.Andersson, N. P. Bergh. 1972. In vivo and in vitro studies on alpha receptors in human airways. *Scand J Respir Dis* 53:227-236.

Sheldrick, R. L., K. F. Rabe, A. Fischer, H. Magnussen, and R. A. Coleman. 1995. Further evidence that tachykinin-induced contraction of human isolated bronchus is mediated only by NK2-receptors. *Neuropeptides* 29(5):281-92.

Silkoff, P. E., J. T. Sylvester, N. Zamel, and S. Permutt. 2000a. Airway nitric oxide diffusion in asthma: Role in pulmonary function and bronchial responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 161(4 Pt 1):1218-28.

Silkoff, P. E., R. A. Robbins, B. Gaston, J. O. Lundberg, and R. G. Townley. 2000b. Endogenous nitric oxide in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 105(3):438-48.

Shimosegawa, T., H. D. Foda, and S. I. Said. 1990. [Met]enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive nerves in guinea-pig and rat lungs: distribution, origin, and co-existence with vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity. *Neuroscience* 36(3):737-50.

Skogh B-E., C. G. Löfdahl, and N. Swedmyr. 1985. Beta-adrenoceptors in ferret tracheal smooth muscle subtyped as beta-1. *Am Rev Respir Dis* 131, A 284.

110. Smith, R. V., and D. G. Satchell. 1985. Extrinsic pathways of the adrenergic innervation of the guinea-pig trachealis muscle. *J Auton Nerv Syst* 14(1):61-73.

Son, H., R. D. Hawkins, K. Martin, M. Kiebler, P. L. Huang, M. C. Fishman, and E. R. Kandel. 1996. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87(6):1015-23.

Springall, D. R., A. Cadieux, H. Oliveira, H. Su, D. Royston, and J. M. Polak. 1987. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J Auton Nerv Syst* 20(2):155-66.

Springall, D. R., V. Riveros-Moreno, L. Buttery, A. Suburo, A. E. Bishop, M. Merrett, S. Moncada, and J. M. Polak. 1992. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* 98(4):259-66.

Stauss, H. M., A. Godecke, R. Mrowka, J. Schrader, and P. B. Persson. 1999. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 33(6):1359-63.

Stretton, C. D., M. G. Belvisi, and P. J. Barnes. 1990. Neuropeptide Y modulates non-adrenergic, non-cholinergic neural bronchoconstriction in vivo and in vitro. *Neuropeptides* 17(4):163-70.

Stretton, D. 1991. Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways [editorial]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 18(10):675-84.

Takahashi, N., H. Tanaka, N. Abdullah, L. Jing, R. Inoue, and Y. Ito. 1995. Regional difference in the distribution of L-NAME-sensitive and -insensitive NANC relaxations in cat airway. *J Physiol (Lond)* 488(Pt 3):709-20.

Tatemoto, K., M. Carlquist, and V. Mutt. 1982. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296(5858):659-60.

Tatemoto, K., J. M. Lundberg, H. Jornvall, and V. Mutt. 1985. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun* 128(2):947-53.

Taylor-Robinson, A.W., F.Y. Liew, A. Severn, D. Xu, S. J. McSorley, and P. Garside 1994. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T-helper typ 1 and T helper typ 2 cells. *Eur J Immunol* 24:980-984.

Taylor-Robinson, A.W. 1997. Counter-regulation of T helper 1 cell proliferation by nitric oxide and interleukin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 233:14-19.

Terenghi, G., G. P. McGregor, S. Bhattacharji, J. Wharton, S. R. Bloom, and J. M. Polak. 1983. Vagal origin of substance P-containing nerves in the guinea pig lung. *Neurosci Lett* 36(3):229-35.

Thomassen, M. J., L. T. Buhrow, M. J. Connors, F. T. Kaneko, S. C. Erzurum, and M. S. Kavuru. 1997. Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(3):279-83.

- Trifilieff, A., Y. Fujitani, F. Mentz, B. Dugas, M. Fuentes, and C. Bertrand. 2000. Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *J Immunol* 165(3):1526-33.
- Tucker, J. F., S. R. Brave, L. Charalambous, A. J. Hobbs, and A. Gibson. 1990. L-NG-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 100(4):663-4.
- Uddman, R., F. Sundler, and P. Emson. 1984. Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res* 237(2):321-7.
- Verastegui, C., J. Fernandez-Vivero, A. Prada, F. Rodriguez, A. Romero, M. Gonzalez-Moreno, and J. M. de Castro. 1997. Presence and distribution of 5HT-, VIP-, NPY-, and SP-immunoreactive structures in adult mouse lung. *Histol Histopathol* 12(4):909-18.
- Verastegui, C., A. Prada Oliveira, J. Fernandez-Vivero, A. Romero, and J. M. de Castro. 1997. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in adult mouse lung. *Eur J Histochem* 41(2):119-26.
- Widdicombe J. G. 1998. Autonomic Regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 158:171-175.
- Willis T. 1681. Opera omnia, Band II, Sect 1, Cap.XI: De asthmate. J. A. Huguetan, Lyon.
- Vincent, S. R., and B. T. Hope. 1992. Neurons that say NO. *Trends Neurosci* 15(3):108-13.
- Ward, J. K., M. G. Belvisi, A. J. Fox, M. Miura, S. Tadjkarimi, M. H. Yacoub, and P. J. Barnes. 1993. Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J Clin Invest* 92(2):736-42.

Ward, J. K., P. J. Barnes, D. R. Springall, L. Abelli, S. Tadjkarimi, M. H. Yacoub, J. M. Polak, and M. G. Belvisi. 1995. Distribution of human i-NANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13(2):175-84.

Weihe, E., D. Nohr, M. J. Millan, C. Stein, S. Muller, C. Gramsch, and A. Herz. 1988. Peptide neuroanatomy of adjuvant-induced arthritic inflammation in rat. *Agents Actions* 25(3-4):255-9.

Xiong, Y., G. Karupiah, S. P. Hogan, P. S. Foster, and A. J. Ramsay. 1999. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol* 162(1):445-52

7. Veröffentlichungen

Veröffentlichungen zum Thema

Originalarbeiten

Q. T. Dinh, D. A. Groneberg, E. C. Mingomataj, J. Springer, and A. Fischer
The extrinsic innervation of the murine lung as studied by retrograde tracing and immunohistochemistry. Am. J. Resp. Crit. Care Med. Eingereicht (2001)

Abstracts von Kongressbeiträgen

Q. T. Dinh, D. A. Groneberg, E. C. Mingomataj, J. Springer, A. Fischer
The extrinsic innervation of the murine lung as studied by retrograde tracing and immunohistochemistry
Am. J. Resp. Crit. Care Med. Im Druck (2001))

Q. T. Dinh, D. A. Groneberg, C. Peiser, A. Gerber, J. Springer, and A. Fischer
Sympathetic and sensory innervation of the murine lung as studied by retrograde tracing and immunohistochemistry
Allergy & Clinical Immunology International. Im Druck (2001)

Weitere Veröffentlichungen

Originalarbeiten

David A. Groneberg, Petra Hartmann, Q. Thai Dinh, Axel Fischer
Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC₂ mRNA in human airways.
Lab. Invest. Im Druck (2000).

David A. Groneberg, Hannelore Daniel, Frank Döring, Q. Thai Dinh, Timothy Oates, Peter J. Barnes, Kian Fan Chung, Axel Fischer.
Distribution and functional aspects of the oligopeptide transporter PEPT2 in normal and cystic fibrosis human lung.
Am. J. Resp. Crit. Care Med. Eingereicht (2000).

Abstracts von Kongressbeiträgen

Q. T. Dinh, C. Becker, D. A. Groneberg, J. Springer and A. Fischer.
Intrinsic innervation of the murine lung
Allergy & Clinical Immunology International. Im Druck (2001)

D. A. Groneberg, P. Eynott, Q. T. Dinh, F. Döring, P.J. Barnes, K.F.Chung, H. Daniel, A. Fischer.
Immunohistochemischer und funktioneller Nachweis des Peptidtransporters PEPT2 in normaler humaner Lunge
Pneumologie. Im Druck (2001).

D.A.Groneberg, P. Hartmann, Q.T. Dinh, E.J. Goetzl, A.Fischer.
Nachweis der VPAC2-Rezeptor-mRNA in zentralen humanen Atemwegen durch In-Situ-Hybridisierung und Northern Blotting
Pneumologie. Im Druck (2001).

D. A. Groneberg, S. Wiegand, Q. T. Dinh, A. Fischer
Presence of immediate early genes in airway-innervating guinea pig sensory neurons under basal conditions
Allergy & Clinical Immunology International. Im Druck (2001)

D. A. Groneberg, C. Peiser, P. Hartmann, Q. T. Dinh, J. Springer, E. J. Goetzl, and A. Fischer
Identification of a specific receptor for the inflammatory mediator vasoactive intestinal polypeptide in the human lung
Allergy & Clinical Immunology International. Im Druck (2001)

8.

LEBENS LAUF

10. 08. 1971 geboren in Saigon/Vietnam als sechster Sohn von
12 Kindern des Ehepaares Vincent Hoang Dinh und
Maria Hang Ngo
- 05/80 Flucht aus Vietnam
- 1981-1982 Grundschule Hollage bei Osnabrück
- 1982-1984 Orientierungstufe Hollage
- 1984-1992 Gymnasium Carolinum Osnabrück, 05/92 Abitur
- 4/94 Beginn des Studiums der Medizin, Univ. Gießen
- 3/96 Ärztliche Vorprüfung
- 1/97 Beginn der Promotionsarbeit
- 3/97 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 3/99 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 4/1999-3/2000 Praktisches Jahr an der Univ. Gießen
- 5/2000 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 6/2000 Arzt im Praktikum,
in der Klinischen Forscher Gruppe Allergologie
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Axel Fischer,
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie/
Immunologie und in der Medizinischen Klinik m. S.
Kardiologie, Angiologie und Pulmologie, Leiter,
Herr Prof. Dr. med. Witt, Klinikum der Humboldt-
Universität zu Berlin.

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, der Universität Gießen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Fischer, ihm möchte ich ganz besonders herzlich für die Möglichkeit der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe und für die geduldige und freundliche Unterstützung und Beratung während der gesamten Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. W. Kummer möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Möglichkeit der Mitarbeit in dieser Arbeitsgruppe und seine Unterstützung während der gesamten Arbeit danken.

Für die freundliche Unterstützung bei der technischen Durchführung dieser Arbeit möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Tamara Fischbach, Frau Petra Hartman, Frau Silke Wiegand und bei Herrn Martin Bodenbenner bedanken. Frau Karin Michael danke ich für die hervorragende Ausführung der photographischen Arbeiten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Marc Scheibner für das Korrektur-Lesen meiner Arbeit. Ich danke auch Herrn David Gronerberg, Herrn Dr. Christian Peiser, Herrn Jochen Springer, Frau Margarita Strozynski für die gute Zusammenarbeit in Rahmen der Klinischen Forscher Gruppe Allergologie.

Ich möchte meinen Eltern, Geschwistern und meiner Verlobten auch für alles danken.