

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Die Innervation der unteren Atemwege**

### **1.1.1 Die autonome Innervation der unteren Atemwege**

Die Innervation der unteren Atemwege setzt sich aus einem afferenten sensiblen oder sensorischen Teil und einem autonomen efferenten Teil zusammen.

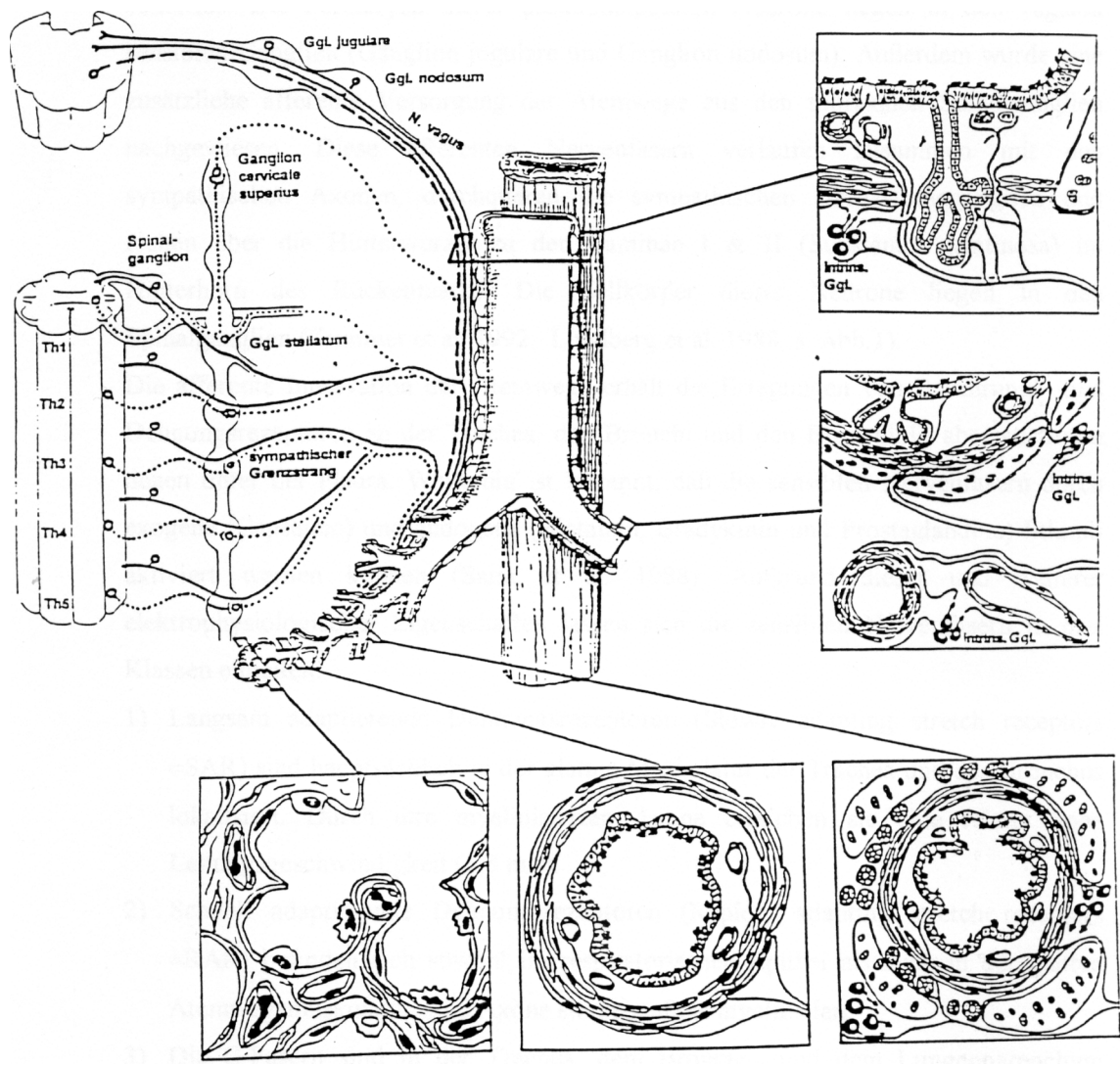
Das autonome System lässt sich aufgrund anatomischer und funktioneller Kriterien in einen parasympathischen und in einen sympathischen Teil gliedern.

Sympathische präganglionäre Fasern verlassen zusammen mit motorischen Fasern über die Vorderwurzel das Rückenmark und ziehen zu den cervikalen und thorakalen Grenzstrangganglien, wo sie mit postganglionären Fasern verschaltet sind. Der Ursprung postganglionärer sympathischer Fasern, die die Atemwege innervieren, liegt im Ganglion cervicale superius und im Ganglion stellatum sowie die Lunge betreffend, in den thorakalen Grenzstrangganglien T2-T4. Der klassische postganglionäre Überträgerstoff des Sympathikus ist Noradrenalin.

Die präganglionären parasympathischen Fasern verlassen den Hirnstamm im Nervus vagus und ziehen mit ihm zu den Organen im Brustraum. Sie enden in lokalen intrinsischen Ganglien, die entlang des Tracheobronchialbaumes liegen. Von den intrinsischen Ganglien ziehen postganglionäre Nervenfasern zu den Zielgebieten der unteren Atemwege. (s. Abb.1)

Als klassischer Überträgerstoff an allen präganglionären vegetativen und an allen parasympathischen sowie einigen sympathischen postganglionären Nervenfasern gilt Acetylcholin.

Neben den klassischen Transmittern Acetylcholin und Noradrenalin existieren eine Reihe weiterer Mediatoren im vegetativen Nervensystem. Zu ihnen zählen Stickstoffmonoxid (NO) (Bredt et al. 1990, Li und Rand 1991), Neuropeptid Y (NPY) (Lundberg et al. 1983b, Uddman et al. 1984) und vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) (Ward et al. 1993).



Sympathische Fasern .....  
 Parasympathische Fasern -----  
 Sensible Fasern \_\_\_\_\_

Abbildung 1: Übersicht: Innervation der Atemwege (aus: Fischer A; Allergologie, 1997)

### 1.1.2 Die sensible Innervation der unteren Atemwege

Die unteren Atemwege werden außer durch vegetative Efferenzen auch durch zahlreiche sensible Fasern innerviert. Der größte Anteil der die Atemwege sensibel versorgenden Fasern verläuft im Nervus vagus. Die pseudounipolaren Zellkörper dieser sensiblen Vagusfasern liegen im Ganglion nodosum und Ganglion jugulare mit den entsprechenden peripheren und zentralen Projektionen in die Atemwege und in die Medulla oblongata (Nucleus tractus solitarii). Die Lunge betreffend ziehen zusätzlich sensible Fasern zusammen mit sympathischen Nerven zu den Spinalganglien (Dalsgaard und Lundberg 1984, Springall et al. 1987, Kummer et al. 1992) und durchqueren dabei das Ganglion stellatum (Saria et al. 1985, Kummer und Oberst 1993).

Die viszerale Afferenzen sind an der neuronalen Regulation der Atmung beteiligt und melden neben Schmerzreizen die Reizung der Mechano- und Chemorezeptoren. An der Synapse der zentralen Projektion setzen sie klassische exzitatorische Transmitter wie Glutamat bzw. Aspartat frei (Dalsgaard 1988).

#### Sensible Fasern

Sensible Fasern, die die Atemwege innervieren, kann man nach morphologischen und physiologischen Kriterien in myelinisierte A-Fasern und in unmyelinisierte C-fasern einteilen (Coleridge und Coleridge 1994).

Aus elektrophysiologischen Untersuchungen verschiedener Species sind folgende Rezeptortypen in den Atemwegen bekannt:

SARs (slowly adapting receptors) sind langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren auf myelinisierten A $\alpha$ - und A $\beta$ -Fasern; sie finden sich in der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchus von Katzen und Hunden. (Guz und Treuchard 1971).

Sie sind für die Regulierung und Kontrolle der physiologischen Atmung zuständig und haben z. B. Einfluß auf die Atemmechanik und den Bronchialmuskeltonus (Widdicombe 1954, Widdicombe und Wells 1994). Ebenso sind sie an Schutzreflexen wie dem Hering-Breuer-Reflex beteiligt (Barnes 1986b).

RARs (rapid adapting receptors) sind schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren. Ihre myelinisierten A $\delta$ -Fasern liegen bei Meerschweinchen unter dem respiratorischen Epithel (Hunter und Udem 1999). Sie sind in den Atemwegen von Hunden und Katzen weit verbreitet, vom Nasopharynx bis in die terminalen Bronchien. Je nach Lage unterscheiden sie sich

hinsichtlich Sensitivität und Reflexantwort. Stimuli sind mechanischer aber auch chemischer Art sowie inflammatorische und immunologische Mediatoren (Sant’Ambrogio und Widdicombe 2001).

RARs in der Trachea und den proximalen großen Bronchien sind sehr mechanosensitiv, während RAR in den distalen Bronchien eher chemosensitiv sind (Widdicombe 2003). Während die mechanische Reizung zu Husten und Schleimproduktion führt, hat die chemische Reizung zusätzlich eine Hyperventilation bzw. eine verstärkte Atmung zur Folge (Sant’Ambrogio und Widdicombe 2001).

Rezeptoren unmyelinisierter C-Fasern sind nozizeptiver Natur; man kann sie entsprechend der Gefäßversorgung in einen bronchialen und in einen pulmonalen Teil gliedern (Coleridge und Coleridge 1994, Widdicombe and Wells 1994).

Pulmonalen C-Faser-Endigungen liegen im Lungenparenchym und in der Wand der Alveolen. Sie reagieren auf eine Volumenzunahme in der Lunge mit Bradykardie, Hypotension, Apnoe gefolgt von flacher, frequenter Atmung (Widdicombe und Wells 1994, Coleridge und Coleridge 1994, Davis et al. 1982)

Bronchiale C-Fasern liegen in der Mukosa der Atemwege; ihre Erregung löst ähnliche Reaktionen und zusätzlich Bronchokonstriktion, Plasmaextravasation und erhöhte Schleimproduktion aus. Außerdem kann über sie der Hustenreflex ausgelöst werden (Coleridge und Coleridge 1994).

C-Fasern sind hochsensibel für chemische Einflüsse oder Substanzen, die im Rahmen einer entzündlichen oder allergischen Gewebsveränderung freigesetzt werden wie Histamin, Bradykinin und Prostaglandine (Chondry et al. 1989, Saria et al. 1988, Belvisi 2002).

Eine charakteristische Eigenschaft der nociceptiven C-Fasern ist ihre Chemosensitivität gegenüber Capsaicin, einer aktiven Substanz aus Pepperoni. Seine Wirkung entfaltet Capsaicin über Vanilloidrezeptoren (TRPV1-), ligandengebundenene Ionenkanäle, die an Nervenendigungen sensibler C-Fasern lokalisiert sind (Barnes 1986c, Belvisi 2002).

<b>Meerschweinchen</b>			
	Fasern mit schnell adaptierendem Rezeptor (RAR)	Fasern mit Nozizeptoren	
	G.nodosum/ A $\delta$	G.jugulare/ C	G.jugulare/ A $\delta$
	Myelinisiert	Unmyelinisiert	Myelinisiert
Immunreaktivität	Substanz P negativ	Substanz P positiv	Substanz P negativ
Leitgeschwindigkeit	$\approx 6\text{m/s}$	$\approx 1\text{m/s}$	$\approx 6\text{m/s}$
Mechanische Reize	Starke Reaktion	Reaktion	Reaktion
Chemische Reize*	Keine Reaktion	Starke Reaktion	Starke Reaktion
<b>Ratte</b>			
	Fasern mit schnell adaptierendem Rezeptor (RAR)	Fasern mit Nozizeptoren	
	G.nodosum/ A $\delta$	G.jugulare/ C	G.jugulare/ A $\delta$
	Myelinisiert	Unmyelinisiert	Myelinisiert
Immunreaktivität	Substanz P negativ	Substanz P positiv	Substanz P negativ
Leitgeschwindigkeit	$\approx 6\text{m/s}$	$\approx 1\text{m/s}$	$\approx 6\text{m/s}$
Mechanische Reize	?	?	?
Chemische Reize*	?	?	?

\* Capsaicin, Bradykinin, hypertone Lösungen

Tabelle 1: Afferente Neurone in den Atemwegen (modifiziert nach B. Udem)

Am Meerschweinchen durchgeführte Untersuchungen bezüglich der Herkunft vagaler Afferenzen, die die Atemwege versorgen, zeigen eine nach elektrophysiologischen und morphologischen Kriterien vorgenommene Aufteilung (s. Tabelle 1).

RAR-Fasern stammen aus Zellkörpern, die im Ganglion nodosum liegen. Sie sind unempfindlich gegenüber Capsaicin. Neben den nozizeptiven C-Fasern existiert eine weitere Gruppe von nozizeptiven Fasern. Diese nozizeptive Fasern, also C-Fasern und die nozizeptiven A $\delta$ -Fasern, entstammen Perikaryen, die im Ganglion jugulare liegen. Sie sind empfindlich gegenüber Capsaicin (Riccio et al. 1996).

In den Nervenendigungen sensibler chemosensitiver C-Fasern sind Neuropeptide lokalisiert. Die Stimulation dieser capsaicinsensitiven Fasern führt zu einem lokalen Reflex oder Axonreflex, der die periphere Freisetzung der Neuropeptide zur Folge hat. Dabei werden zum einen Neuropeptide durch die Erregung efferenter Fasern über den lokalen Reflexbogen freigesetzt; zum anderen können Neuropeptide direkt am betroffenen afferenten Nervenende nach eingegangenem Stimulus freigesetzt werden. Dieser Vorgang beschreibt der Begriff der

neurogenen Entzündung (Jancsó 1960) und wird als „efferente Funktion sensibler Fasern“ bezeichnet (Barnes 1986c).

Neben den beschriebenen Fasern des sensiblen (afferenten) Nervensystems existieren sogenannte „Neuroepitheliale Zellkörper“ (NEBs). Diese sind Zellkörper, die bioaktive Mediatoren wie Substanz P (SP) und Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) enthalten. Von ihnen gehen sensorische Fasern aus, die den unmyelinisierten ähneln (Widdicombe 2001, Belvisi 2002).

## **1.2 Mediatoren**

### **1.2.1 Klassische Mediatoren**

#### **1.2.1.1 Noradrenalin (NA)**

NA gehört zu den Katecholaminen und ist der klassische Transmitter der postganglionären sympathischen Übertragung. Die Katecholamine werden in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sowie in sympathischen Neuronen synthetisiert und gemeinsam mit ATP in Vesikeln gespeichert (Falck et al.1962).

Substrat der NA-Synthese ist die Aminosäure Tyrosin, Schrittmacherenzym der mehrstufigen Synthese ist Tyrosinhydroxylase (TH). Nach Methylierung von NA entsteht als ein weiteres Katecholamin Adrenalin.

Die in den Atemwegen vorkommenden katecholaminhaltigen Nervenfasern wurden in zahlreichen Studien untersucht. Um die Transmitter selber nachweisen zu können, bediente man sich Anfang der 60er Jahre einer fluoreszierenden histochemischen Methode, mit deren Hilfe NA als „small intensely fluorescent“ (SIF) in den Nervenendigungen noradrenerger Nerven nachgewiesen werden konnte. Auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind noradrenerge Fasern in den Atemwegen beschrieben worden (Richardson 1979). Später konnte die Existenz von Katecholaminen mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch an Enzyme wie Tyrosinhydroxylase binden, nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Studien am Meerschweinchen wurden katecholaminhaltige Fasern um die Gefäße und entlang der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchien nachgewiesen (Coburn und Tomita 1973, O'Donell und Saar 1973, O'Donell et al. 1978, Smith und Satchell 1985).

Durch die Kombination von Immunhistochemie und retrogradem Tracing wurde die Herkunft katecholaminhaltiger Nervenfasern ermittelt. Perikaryen, die TH enthalten und in die Lunge

projizieren, sind zu einem beträchtlichen Anteil auch immunreaktiv für Neuropeptid Y (NPY) und liegen in den sympathischen Ganglien, dem Ganglion stellatum und dem Ganglion cervicale superius. Auch in intrinsischen parasymphatischen Ganglien des Meerschweinchens konnten TH-haltige Nervenfasern nachgewiesen werden (Baluk und Gabella 1989, Kummer et al. 1992). Sympathische Fasern in den Atemwegen versorgen pulmonale und bronchiale Blutgefäße, submuköse Drüsen und lokale Ganglien. Vergleichsweise wenige Nerven ziehen zur glatten Muskulatur in den Atemwegen (Richardson 1979).

Die Beurteilung der Rolle einer direkten sympathischen nervalen bzw. funktionellen Kontrolle der glatten Muskulatur der Atemwege fällt sehr unterschiedlich aus und ist auf die beträchtlichen Speciesunterschiede bezüglich der sympathischen Faserdichte zurückzuführen (Barnes 1986a, Goldie et al. 1990, Doidge und Satchell 1982).

So ist im Gegensatz zum Menschen die Faserdichte der Atemwege von Katzen und Meerschweinchen höher, und es lässt sich hier *in vitro* eine Bronchodilatation mittels elektrischer Feldstimulation (EFS) auslösen (Richardson 1979, Partanen et al. 1982).

NA wirkt an verschiedenen G-Protein-gekoppelten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren.

$\alpha$ -1-Rezeptoren und  $\alpha$ -2-Rezeptoren sind postsynaptisch an den Zielorganen lokalisiert. Ihre Aktivierung führt zu einer Tonuserhöhung der glatten Muskulatur, in erster Linie in den Gefäßen. So wirkt NA durch intrazelluläre Freisetzung von Kalziumionen vasokonstriktorisch (Barnes 1986a, Goldie et al. 1990, Hyman und Kadowitz 1986).

Über präsynaptische  $\alpha$ -2-Autorezeptoren auf Nervenendigungen vegetativer Neurone reguliert NA deren Neurotransmitterausschüttung (Andersson und Grundström 1987, Lou 1993), sowie seine Ausschüttung an sympathischen Nervenendigungen (Lacroix 1989).

Eine hohe Anzahl von  $\beta$ -Rezeptoren findet sich in der humanen Lunge. Sie ließen sich autoradiographisch im respiratorischen (bronchialen) Epithel, in submukösen Drüsen und in der glatten Muskulatur nachweisen (Spina et al. 1989b, Hamid et al. 1991). Die über sie vermittelte Bronchodilatation wird therapeutisch durch die Wirkung von  $\beta$ -Mimetika genutzt (Davis et al. 1982, Goldie et al. 1990). Analog kann der bronchodilatatorische Effekt durch Gabe eines nicht-selektiven  $\beta$ -Adrenorezeptor-Antagonisten bei Meerschweinchen aufgehoben werden (Grundström et al. 1981).

$\alpha$ -Adrenorezeptoren, die eine Bronchokonstriktion vermitteln, konnten in verschiedenen Species nachgewiesen werden, wenn auch nur unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. bei entzündlichen Vorgängen wie Asthma (Barnes und Liew 1995, Kneussl und Richardson 1978, Goldie 1990). Auch bei der durch  $\alpha$ -Agonisten ausgelösten Bronchokonstriktion gibt es beträchtliche Speciesunterschiede; die Reaktion reicht von erheblich bis zu minimal oder nonexistent, wie bei

Meerschweinchen, Ratten und auch Menschen (Barnes 1986a, Goldie 1990). Ein autoradiographischer Nachweis von  $\alpha$ -Rezeptoren in humanem Lungengewebe gestaltet sich jedoch schwierig, und der erwartete bronchodilatatorische Effekt von  $\alpha$ -Antagonisten bleibt aus (Barnes und Liew 1995, Spina et al.1989b).

Ist auch der funktionelle Einfluß auf die glatte Muskulatur in den menschlichen Atemwegen zweifelhaft, kann NA jedoch über präsynaptische Rezeptoren die cholinerge und interganglionäre Neurotransmission beeinflussen und so indirekt Einfluss auf den Tonus der Bronchialmuskulatur nehmen (Barnes 1986a, Udem et al. 1990, Daniel et al. 1986, Davis et al.1982 ) Auch eine über präsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermittelte Hemmung des e-NANC-Systems (s.u.) konnte am Meerschweinchen in vivo beobachtet werden (Grundström und Anderson 1985, Jaccobsson et al. 1991).

### **1.2.1.2 Acetylcholin**

Als klassischer Überträgerstoff an allen präganglionären vegetativen und an allen parasympathischen sowie einigen sympathischen postganglionären Nervenfasern gilt Acetylcholin. Zudem ist es für die Signalübertragung an der motorischen Endplatte und an etlichen Synapsen im ZNS verantwortlich.

Seine Synthese erfolgt im Zytoplasma der Nervenendigungen aus Cholin und Acetyl-Coenzym-A mit Hilfe des Enzyms Cholinacetyltransferase. In den Nervenendigungen wird es in Vesikeln gespeichert.

ACh wirkt an zwei Typen von Rezeptoren, die entsprechend ihrer Ansprechbarkeit auf Nikotin bzw. Muskarin als nicotinerge und muscarinerge Rezeptoren bezeichnet werden (Übersicht bei Gotti et al. 1990, Minette und Barnes 1990).

Während die Bindung von ACh an nicotineren Rezeptoren direkt zu einer Erhöhung der Durchgängigkeit für Natrium und Kalium-Ionen führt, ist die Wirkung an den muskarinen Rezeptoren an G-Proteine gekoppelt.

Die Wirkung des ACh wird durch seine enzymatische Spaltung im synaptischen Spalt mit Hilfe des Enzyms Acetylcholinesterase beendet.

ACh aus postganglionären cholinergen Nervenendigungen bewirkt eine Atemwegskontraktion über in der Muskulatur liegende M3-Rezeptoren. Ebenso finden sich M3-Rezeptoren an submukösen Drüsen; ihre Aktivierung durch ACh führt zu Schleimsekretion (Minette und Barnes 1990).



Über M2-Rezeptoren auf cholinergen präganglionären Nervenendigungen wird als Autorezeptoren die Ausschüttung des ACh reguliert (Minette und Barnes 1990).

M1-Rezeptoren an parasympathischen Ganglienzellen spielen eine Rolle bei der cholinergen Neurotransmission (Minette und Barnes 1990).

Cholinerge Fasern ließen sich am Meerschweinchen in der Atemwegsmuskulatur von der Trachea bis in die Bronchioli terminales, sowie in der Submukosa von Trachea und Bronchien immunhistochemisch nachweisen, wobei die Dichte zur Peripherie hin abnimmt (Canning und Fischer 1997).

## **1.2.2 NANC-Mediatoren**

Im Rahmen neuerer Forschungsarbeiten, deren Ausgangspunkt die gezielte Blockade der adrenergen und cholinergen Übertragung war, wurden bisher unbekannte Transmittersubstanzen identifiziert. Die Entdeckung dieser Co-Transmitter in den klassischen Systemen führte in letzterer Konsequenz zu der Aufstellung eines weiteren als nicht-adrenerg, nicht cholinerg (NANC) bezeichneten Systems.

Neben den klassischen Transmittern des peripheren Nervensystems existieren eine ganze Reihe weiterer Mediatoren in efferenten wie auch afferenten Nerven. Die wesentlichen NANC-Effekte werden über die als Neuropeptide identifizierten Substanzen und den Mediator NO vermittelt. Sie haben dabei vielfältigen Einfluss auf den Muskeltonus von Bronchien und Gefäßen, auf die Drüsensekretion sowie auf immunkompetente Zellen und Entzündungszellen.

Die unterschiedliche Wirkung dieser Mediatoren legte eine Aufteilung des NANC-Systems in einen exzitatorischen (e-NANC) und einen inhibitorischen (i-NANC) Teil nahe. Zu den inhibitorischen Substanzen mit bronchodilatatorischer Wirkung zählen Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) und Stickstoffmonoxid (NO). Substanzen mit exzitatorischer Wirkung, die eine Bronchokonstriktion auslösen, sind CGRP und die Tachykinine.

### **1.2.2.1 Neuropeptid Y (NPY)**

NPY ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes tyrosinhaltiges Polypeptid; es wurde 1982 erstmals aus dem Gehirn von Schweinen isoliert (Tatemoto et al. 1982). Es gehört zu der Familie der pankreatischen Polypeptide, zu der auch das pankreatische Polypeptid PP und das Polypeptid

YY gehören. Y steht hierbei für die Aminosäure Tyrosin. Während PP und YY hormonellen Charakter haben, fungiert NPY als Neuromediator. Seine peripheren wie auch zentralen Wirkungen werden über NPY-Rezeptoren vermittelt; man geht mittlerweile von 6 Subtypen (Y1-Y6) aus. Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, sogenannte GPCRs (Ingehoven und Beck-Sicking 1999, Berglund et al. 2003).

Im peripheren Nervensystem wird NPY als Co-Transmitter zu Noradrenalin in postganglionären Sympathikusneuronen gebildet. Man findet es in den sympathischen Nerven in kleinen Vesikeln oder zusammen mit Katecholaminen in großen Vesikeln (Lundberg et al. 1983b, Ekblad et al. 1984, Fried et al. 1985, Jarvi et al. 1986).

Im gesamten Respirationstrakt findet man NPY-haltige Nervenfasern (Sheppard et al. 1984), so untersucht bei verschiedenen Species wie Katze, Meerschweinchen, Ratte und Maus (Uddman et al. 1984, Verastegui et al. 1997) sowie beim Menschen (Lundberg et al. 1983b). Sie sind in den Atemwegen entlang der Blutgefäße, an seromukösen Drüsen und in der glatten Muskulatur der tracheobronchialen Wand zu finden (Uddman et al. 1984). Durch immunhistologische Studien lässt sich häufig die Co-Expression von NPY und TH in den zu den Atemwegen projizierenden Neuronen beobachten (Jarvi et al. 1986). In einer Studie am Meerschweinchen wurde durch Kombination von retrogradem Tracing und Doppelimmunhistologie der Ursprung solcher NPY/TH-immunreaktiven Fasern ermittelt. In den sympathischen Ganglien, Ganglion stellatum und Ganglion cervicale superius, war der Großteil der NPY positiven Neurone auch immunreaktiv für TH. Für den geringeren Teil der katecholamin-negativen Neurone wurde eine Coexpression von NPY mit VIP angenommen (Kummer et al. 1992). In einer ähnlich gearteten Studie konnte NPY zusammen mit VIP in katecholamin-negativen Nervenfasern, die die Trachea des Meerschweinchens versorgen, nachgewiesen werden (Bowden und Gibbins 1992).

NPY wirkt als Neuromodulator und kann viele Funktionen in den Atemwegen durch seinen Einfluss auf Neurotransmitter beeinflussen. Neben seinem Einfluß auf den Tonus der glatten Muskulatur in den Atemwegen und in Gefäßen ist NPY an Vorgängen des Immunsystems beteiligt (Übersicht bei Groneberg et al. 2004).

#### Wirkung an der glatten Muskulatur der Atemwege

In einer Studie am Meerschweinchen konnte NPY aus adrenergen Nerven ein inhibitorischer Effekt auf die cholinerge Transmission zugewiesen werden. Dabei wurde von einer direkten Wirkung an präsynaptischen Rezeptoren auf cholinergen Nervenenden ausgegangen (Stretton und Barnes 1988). Ebenso konnte in weiteren Untersuchungen ein hemmender Einfluß von NPY

auf die e-NANC- vermittelte Bronchokonstriktion in vivo und in vitro nachgewiesen werden (Stretton et al. 1990).

Ursächlich wird hierbei von einer Hemmung der Tachykinin-Freisetzung an sensiblen Nervenendigungen ausgegangen. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass NPY die neurogene Plasmaextravasation vermindern kann. Hier wird ein präsynaptischer Effekt angenommen, da die durch exogene SP verursachte Plasmaextravasation nicht verhindert werden konnte (Stretton et al. 1990).

Auch konnte die Vorbehandlung mit einem an Y2-Rezeptoren wirkenden NPY-Agonisten die Reaktion (Bronchokonstriktion) auf eine Histamin-Provokation abschwächen (Malis et al. 1999). In einer weiteren Studie wurde sowohl die Wirkung von NPY an der glatten Muskulatur in den Atemwegen, als auch die Beeinflussung verschiedener Agonisten durch NPY untersucht.

Hier hatte NPY einen kontrahierenden Einfluss und konnte die Reaktion der Muskulatur auf VIP, NA, SP und 5-HT abschwächen. Man ging von einer präsynaptischen als auch von einer postsynaptische Wirkung aus (Benckekronn et al. 1992).

#### Wirkungen an der glatten Gefäßmuskulatur

Analog zu seinem Vorkommen in noradrenergen Fasern entlang der Blutgefäße ist die Wirkung von NPY auf die glatte Gefäßmuskulatur untersucht worden.

In einer Studie an der Trachea von Hunden konnte gezeigt werden, dass NPY einen dosisabhängigen konstriktorischen Effekt auf die Gefäße hat. Diese Wirkung setzt subakut ein, ist jedoch stark und langanhaltend (Laitinen et al. 1987). Sie wird vor allem durch die Aktivierung von peripheren Y1-Rezeptoren verursacht (Grundemar und Hogestratt 1992, Grundemar et al. 1992)

In weiteren Studien am Schwein wurde ebenfalls ein vasokonstriktorisches Effekt von NPY auf Gefäße an Trachea, Bronchus und Lunge beobachtet (Franco-Cereceda et al. 1995, Martling et al. 1990).

Aufgrund des Vorkommens von NPY-haltigen Nervenfasern an submukösen Drüsen wurde ein Einfluß von NPY auf die Sekretion vermutet. Nach Studien an der Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis wurde von einem hemmenden Effekt des NPY auf die Schleimproduktion ausgegangen (Lacroix et al. 1996, Lacroix und Mosimann 1996), nachdem durch eine Vorbehandlung mit NPY die durch Allergen provozierte Erhöhung des Luftwiderstandes und der Schleimproduktion verringert werden konnte. Andere Studien an der Nasenschleimhaut ließen jedoch keine Beteiligung von NPY an der Drüsenregulation erkennen

(Mullal et al. 1992, Baraniuk et al. 1992). Die Verabreichung von NPY konnte jedoch die durch Bradykinin hervorgerufene Albuminexsudation und den nasalen Atemwiderstand reduzieren.

### Wirkungen im Immunsystem

NPY hat sowohl auf zelluläre als auch auf humorale Anteile des Immunsystems Einfluss. So hat es Auswirkung auf die T-Helferzellendifferenzierung über eine Induktion oder Hemmung von Entzündungsmediatoren wie IL-4 und IFN $\gamma$  und beeinflusst so das Verhältnis von Th1 zu Th2-Zellen (Kawamura et al. 1998, Bedoni et al. 2003).

Auch die Histamin-Sekretion von Mastzellen in der humanen Haut (Emadi-Khiav et al. 1995) und im Peritoneum von Ratten (Mousli et al. 1995, Shen et al. 1991) kann durch NPY induziert werden. Hierbei wurde von einer direkten Aktivierung von G-Proteinen ausgegangen.

NPY kann die Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen aus Monozyten der Maus verstärken, wie in einem in-vitro-Experiment beobachtet wurde (De la Fuente et al. 2001).

Auch ein entzündliches Ödem an der Pfote der Ratte konnte durch die Wirkung von NPY an peripheren Y1- und Y2-Rezeptoren beeinflusst werden (Dimitrijevic et al. 2002).

Über Y1-Rezeptoren kann NPY die IL-6-Freisetzung aus Makrophagen der Milz hemmen (Straub et al. 2000).

Durch seine vielfältigen Wirkungen im Immunsystem kann man von einer Beteiligung von NPY bei der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen ausgehen. So wurden auch erhöhte NPY-Serumspiegel an Patienten mit Asthmaexacerbation gemessen (Dahlof et al. 1988). Die Dichte von NPY-haltigen Nervenfasern in der Mucosa des Respirationstrakts von Patienten mit entzündlichen Atemwegserkrankungen bleibt hingegen konstant (Howarth et al. 1995).

### **1.2.2.2 Stickstoffmonoxid (NO)**

NO ist ein gasförmiges Molekül, das ubiquitär im menschlichen Körper vorkommt. Lange bevor NO als Transmittersubstanz entdeckt wurde, wusste man von der vasodilatatorischen Wirkung von Nitro-Verbindungen. Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wurde auf einen sogenannten endothelial-derived relaxing factor (EDRF) zurückgeführt, der sich später als NO identifizieren ließ (Palmer et al. 1987, Ignarro et al. 1987).

NO nimmt vielfach Einfluss auf physiologische Atemfunktionen. So wird durch NO der Tonus der glatten Muskulatur in den Gefäßen der Atemwege und in den Atemwegen selbst reguliert (Palmer et al. 1987, Li und Rand 1991, Liu et al. 1992, Belvisi et al. 1992b).

Seine Synthese aus der Aminosäure Arginin findet mit Hilfe eines Enzyms, das in drei verschiedenen Isoformen (NOS I, II, III) vorliegt, in unterschiedlichen Zellen der Lunge statt (Moncada et al. 1989).

NOS I oder neuronale NOS (nNOS) findet man vorwiegend im Nervensystem, wo NO als Neuromediator des i-NANC-Systems fungiert (Bredt et al. 1990). Im Gegensatz zu den Neurotransmittern wird NO wegen seiner gasförmigen Natur nicht in Vesikel oder Zellfortsätzen gespeichert, sondern bei Bedarf synthetisiert (Bredt und Snyder 1992).

NOS III (endotheliale NOS, eNOS) wird in den Endothelzellen der Lunge exprimiert. NO wirkt hier relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur (Stauss et al. 1999), und außerdem wird die Thrombozytenaggregation und -adhäsion an der Gefäßwand gehemmt (Freedmann et al. 1999).

NOS I und NOS III sind konstitutiv exprimierte Enzyme; ihre Bildung wird durch das kalziumabhängige Protein Calmodulin reguliert (Bredt et al. 1990).

NOS II hingegen ist die induzierbare Form (iNOS) und ihre Bildung ist kalziumunabhängig. Während entzündlicher Prozesse, wie beim Asthma bronchiale, findet eine verstärkte, teils überschießende Expression der NOS II in den unterschiedlichen Zellen der Lunge statt (Hamid et al. 1991, Saleh et al. 1997). Man findet sie unter anderem in Gefäßendothelien und Atemwegsepithelien, in der glatten Atemwegs- und Gefäßmuskulatur sowie in deren Nervenfasern. Vor allem aber wird NOS II in den Entzündungszellen und Immunzellen, wie Alveolarmakrophagen und eosinophilen Granulozyten, exprimiert (Fischer et al. 2002).

Endogene wie auch exogene Faktoren wirken als Stimuli, die eine Expression von NOS II auslösen. Hierzu zählen Lipopolysaccharide, Zytokine und TNF- $\alpha$ . Dabei kommt dem gebildeten NO nicht immer eine physiologische Rolle zu; bei überschießenden Reaktionen, wie sie bei entzündlichen Prozessen vorkommen, hat es auch schädigende Wirkung (Barnes und Belvisi 1993, Barnes 1996, Berlyne und Barnes 2000).

n-NOS immunreaktive Nervenfasern konnten durch NADPH-Diaphorase Technik und durch Immunhistochemie in den Atemwegen von Meerschweinchen, Frettchen, Ratte und vom Menschen nachgewiesen werden (Fischer et al. 1993, Dey et al. 1993, Fischer und Hoffmann 1996). NOS-immunreaktive Nervenfasern bilden ein dichtes Geflecht in der Bronchialmuskulatur des Menschen und der Ratte (Kobzik et al. 1993) und sind entlang der submukösen Drüsen und Blutgefäße in den menschlichen Atemwegen lokalisiert. Dabei nimmt

die Dichte der Fasern an der glatten Muskulatur von der Trachea zu den peripheren Bronchi hin ab (Ward et al. 1995, Fischer und Hoffmann 1996). Perikaryen der zu den Atemwegen projizierenden Fasern mit NOS-Immunreaktivität konnten im Meerschweinchen durch retrograde, neuronale Markierung bestimmt werden. Sie finden sich größtenteils in den parasympathischen, intrinsischen Ganglien in Trachea und Bronchus, aber auch in sensiblen Vagusganglien (Ganglion nodosum, Ganglion jugulare) sowie in einigen sympathischen Ganglien (Fischer und Hoffmann 1996, Fischer et al. 1996b).

In Tierexperimenten mit elektrischer Feldstimulation (EFS) konnte eine bronchodilatatorische Wirkung von NO beobachtet werden, und NO wurde neben VIP als i-NANC-Mediator eingeordnet (Li und Rand 1991, Tucker et al. 1990). Im Gegensatz zum Meerschweinchen, wo VIP der Hauptmediator zu sein scheint, konnte beim Menschen NO durch in-vitro-Experimente an den Atemwegen eine dominante Rolle als Bronchodilatator zugeschrieben werden (Belvisi et al. 1992b, Belvisi und Bai 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass die Relaxation durch NO zu einer Erhöhung des zyklischen GMP in der Zelle führt (Ward et al. 1995).

Auch durch seine Wirkung auf den Tonus von Lungengefäßen hat NO Einfluss auf Atemwegsfunktionen im Sinne der Ventilations-Perfusionsabstimmung.

Durch die relaxierende Wirkung von endothelialen, aber auch neuronalem NO kann die Zirkulation in der Lungenstrombahn beeinflusst werden (Liu 1992). Nach vorbestehender Kontraktion konnte in Lungenarterien durch EFS eine Relaxation ausgelöst werden, die durch Tetrodotoxin, einem Nervengift, welches durch Blockade spannungsabhängiger Na-Kanäle zu einer Lähmung führt, beeinflussbar war, nicht aber durch adrenerge oder cholinerge Antagonisten (Scott et al. 1996). Endogenes NO kann eine Plasmaexsudation durch Erhöhung des Blutflusses in postkapilären Venolen begünstigen und somit ein Lungenödem verursachen (Kuo et al. 1992).

Die Wirkung von NOS-Inhibitoren auf die Plasmaexsudation fällt unterschiedlich aus und scheint vom Aktivierungsgrad der NOII-Synthase abhängig zu sein, was letztendlich der Vorstellung einer physiologischen, z.T. aber auch schädigenden Wirkung von NO entspricht (Bernareggi et al. 1997).

NO unterdrückt die T-Helfer-Zell-Proliferation und verschiebt somit das Th1/Th2-Gleichgewicht zugunsten von Th2 und Eosinophilie (Taylor-Robinson et al. 1993, Barnes und Liew 1995).

Nach Blockade der NO-Synthase mittels L-NAME ist eine verminderte Einwanderung von Eosinophilen in die Lunge zu beobachten (Ferreira et al. 1996). Außerdem scheint NO auch die Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose von Eosinophilen zu verhindern, ebenso ist eine verlängerte Lebensdauer von Eosinophilen nach Gabe von NO-Donoren beobachtet worden (Hebestreit et al. 1998, Beauvais et al. 1995).

Die Häufigkeit von Infekten war bei knock-out-Mäusen, denen das NOSII-Gen fehlte bzw. entfernt worden war, erhöht (Wei et al. 1995, Laubach et al. 1995).

Aber auch antiinflammatorische Effekte sind für NO beschrieben worden (Silkoff et al. 2000, Thommassen et al. 1997).

In einer Untersuchung an BN-Ratten konnte nach Sensibilisierung durch Ovalbumin eine erhöhte NOS-Gen-Expression im Lungengewebe nachgewiesen werden (Liu et al. 1997).

Auch in den Atemwegen von Asthmatikern wurde eine verstärkte Expression des NOSII-Gens, besonders in Makrophagen und Epithelzellen, nachgewiesen (Hamid et al. 1993).

Durch die vermehrte Expression in den Zellen der Lunge kann auch eine erhöhte Konzentration von NO in der Atemluft von Asthmatikern, wohin es durch Diffusion gelangt, gemessen werden (Barnes und Kharitonov 1996).

### **1.2.2.3 Tachykinine**

Substanz P (SP) kann man als Prototyp der Tachykinine ansehen. Sie ist seit 1931 bekannt und ihre Aminosäuresequenz ist von Chang 1971 erstmals aufgeschlüsselt worden (Chang et al. 1971). Gemeinsam ist den Tachykininen die Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende (Erspamer 1981). Später wurden weitere Tachykinine, wie Neurokinin A (NKA), Neurokinin B (NKB) und Neuropeptid K, in verschiedenen Säugetierarten und beim Menschen identifiziert (Kimura et al. 1983).

#### Effekte der Tachykinine in den Atemwegen

Substanz P und NKA sind Tachykinine, die man in unmyelinisierten sensiblen C-Fasern in den Atemwegen verschiedener Species nachweisen konnte (Uddman et al. 1997).

Nervenfasern mit Immunreaktivität für SP wurden im Larynx, in der Trachea, in und um Bronchien, aber auch in noch distaleren Abschnitten der Atemwege, gelegentlich bis in die Alveolen reichend, beschrieben. Man findet sie unter und zwischen den Epithelzellen, entlang der Blutgefäße, an submukösen Drüsen, in der glatten Muskulatur der Bronchien und um lokale

Ganglien in Trachea und Bronchus gelegen (Lundberg et al. 1984, Luts et al. 1993, Baluk und McDonald 1998).

Stimuli, die die Ausschüttung von Tachykininen an Nervenendigungen capsaicinsensitiver Afferenzen zur Folge haben, sind chemische Irritantien wie inhalativer Zigarettenrauch, hypertone Kochsalzlösung oder Inhalation von Ozon oder Formaldehyd (Karlsson et al. 1991, Lundberg et al. 1983a). Ebenso können Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Leukotrien D<sub>4</sub>, Zytokine wie Interleukin 1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , sensible Fasern stimulieren (Chondry et al. 1989, Cunha et al. 1992). Auch Bradykinin wirkt als Stimulus für eine Tachykinin-Ausschüttung (Saria et al. 1988).

Die vielfältigen Wirkungen der Tachykinine in den Atemwegen werden über die dortigen Tachykinin-Rezeptoren NK1 und NK2 vermittelt. So nehmen sie z. B. Einfluss auf den Tonus der Bronchialmuskulatur und beeinflussen die Sekretion in den Atemwegen, außerdem können sie auch an Gefäßen eine Dilatation und eine Plasmaextravasation auslösen.

Die bronchokonstriktorische Wirkung der TK konnte in verschiedenen Tierarten und beim Menschen nachgewiesen werden. Sie wird über den NK2-Rezeptor und vornehmlich durch NKA ausgelöst (Hua et al. 1984). NK2-Rezeptoren konnten auch direkt in der glatten Muskulatur von Meerschweinchen und im Menschen nachgewiesen werden (Lou 1992, Lou et al. 1993, Advenier et al. 1992).

In vitro löst SP beim Menschen eine verstärkte Schleimproduktion der submukösen Drüsen aus (Rogers et al. 1989) und bewirkt über den NK1-Rezeptor eine verstärkte Becherzell-Sekretion in den Atemwegen von Meerschweinchen (Kuo et al. 1992).

Über den NK1-Rezeptor wird auch eine verstärkte Plasmaexsudation und eine vasodilatatorische Wirkung der TK vermittelt (Saria et al. 1983). Ein Vorgang, der durch das Öffnen von sogenannten „endothelial gaps“ zustande kommt, was am Meerschweinchen und an der Ratte nachgewiesen werden konnte (McDonald et al. 1988).

TK können die cholinerge Neurotransmission durch Erleichterung der Ach-Freisetzung am cholinergen Nervenende und durch eine vereinfachte Transmission im Ganglion verstärken (Hall et al. 1989, Watson et al. 1993) und beeinflussen eine Vielzahl von Entzündungszellen in ihrer Funktion.

TK verstärken die Chemotaxis von Eosinophilen und können Alveolarmakrophagen und -monozyten zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, wie IL6, veranlassen (Brunelleschi et al. 1990, Brunelleschi et al. 1992, Lotz et al. 1988). Ihre Wirkung erzielen sie über Tachykinin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen (Ho et al. 1997).



Substanz P kann spezifisch die T-Zell-Aktivierung beeinflussen (Payan et al. 1983, McGillis et al. 1987) und die Neubildung von Blutgefäßen, die Angiogenese, wie sie bei Asthmatikern beobachtet wird, anregen (Barnes 2001).

SP und NKA stimulieren die Proliferation und Chemotaxis humaner Lungenfibroblasten und können an fibrotischen Prozessen bei chronischem Asthma beteiligt sein (Harrison et al. 1992).

Darüber hinaus degranuliert SP Mastzellen der Haut (Kroegel et al. 1990) und eosinophile Granulozyten (Pauwels et al. 1989) über einen nicht-Rezeptor vermittelten Mechanismus.

TK werden durch mindestens 2 Enzyme abgebaut: Das Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) und die neurale Endopeptidase (NEP) (Di Maria et al. 1998).

Während ACE hauptsächlich im Gefäßendothel lokalisiert ist, wird die NEP in Epithelzellen der Atemwege exprimiert und sorgt hier für den Abbau der Tachykinine (Frossard et al. 1989). So konnte die Beobachtung gemacht werden, dass die mechanische Entfernung des respiratorischen Epithels die bronchokonstriktorische Wirkung der TK um ein Vielfaches verstärkte. Dies erklärte man sich mit dem Wegfall des abbauenden Enzyms NEP (Frossard et al. 1989).

In vitro-Experimente an Tiermodellen mit gezielter Blockade der NEP mittels Phosphoramidon konnten die bronchokonstriktorische Eigenschaft der Tachykinine bestätigen (Stimler-Gerard 1987, Sekizawa et al. 1987).

Zudem vermindern zahlreiche Stimuli, die bei Asthmatikern eine Bronchokonstriktion auslösen können, die Aktivität der NEP. Dazu zählen die mechanische Entfernung von Epithel, Virusinfektionen der Atemwege (Borson et al. 1989) und die Inhalation von Zigarettenrauch (Dusser et al. 1989).

### **1.3 Ziele und Fragestellung**

Die Entdeckung der neurogenen Entzündung (Jancsó 1960, Jancsó et al. 1967) und ihre Bedeutung für verschiedene Organe und deren Erkrankungen haben die Erforschung der Neuromediatoren in den letzten 20 Jahren stark vorangetrieben.

So wissen wir heute, dass die neurogene Entzündung eine wesentliche Bedeutung z. B. bei den hauptsächlichsten Erkrankungen der Atemwege und der Lunge, Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, hat (Lundberg 1995).

In den letzten Jahren hat sich die Brown Norway Ratte als Tiermodell mehr und mehr durchgesetzt, da sie sich als besonders geeignet herausgestellt hat für die Untersuchung der

bronchoalveolären Lavage (BAL), sowohl was die Veränderungen entzündungsspezifischer Zellen als auch was die Extravasation, gemessen an der Proteinkonzentration in der BAL, anlangt (Tarayre et al. 1992, Elwood et al. 1991, Elwood et al. 1992, Haczku et al. 1995).

Das Interesse an der Ratte wurde verstärkt durch Forschungsarbeiten mit transgenen Tieren. Der bislang fast ausschließlich verwendeten transgenen Maus wird neuerdings vermehrt die transgene Ratte an die Seite gestellt. Wegen der zunehmenden Bedeutung der Ratte, speziell der Brown-Norway Ratte (Schneider et al. 1997), als Tiermodell in der Lungenpharmakologie und in der Arzneimittelforschung hat auch das Interesse nach genauerer Charakterisierung der sensiblen und sympathischen Innervation der unteren Atemwege in dieser Spezies zugenommen. Ursprung der Nervenfasern und der Mediatorengehalt der Neurone, die in die normale und pathologisch veränderte Lungenfunktion der BN-Ratte eingebunden sind, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Es lag deshalb aus den angeführten Gründen nahe, das Vorkommen wichtiger Neuromediatoren der sensiblen Vagusganglien, welche die unteren Atemwege versorgen, wie das Ganglion nodosum und das Ganglion jugulare, zu untersuchen. Wegen ihrer besonderen Bedeutung für die entzündungsbedingte Extravasation wurde zu diesem Zwecke die neurogene Substanz P und neuronales und vasoaktives NO als lokal wirkende Vaso- und Bronchomediatoren ausgewählt.

Von den sympathischen für die Atemwege wichtigen Ganglien wurde das Ganglion stellatum und das Ganglion cervicale superius untersucht, und zwar hinsichtlich des sowohl isolierten wie auch gemeinschaftlichen Vorkommens (Kokalisation) von Neuropeptid Y (NPY) und Tyrosinhydroxylase (TH), einem Enzym der Katecholaminsynthese.

Im Einzelnen wurden folgende Aspekte untersucht:

- I. Identifizierung sensibler Neurone in den vagalen Ganglien, Ganglion nodosum und Ganglion jugulare, mit Projektion zu den unteren Atemwegen mittels retrograder neuronaler Markierung.
- II. Identifizierung sympathischer Neurone in den sympathischen Ganglien, Ganglion stellatum und Ganglion cervicale superius, mit Projektion zu den unteren Atemwegen mittels retrograder neuronaler Markierung.
- III. Immunhistochemischer Nachweis von SP und NOS und mögliche Kokalisation in retrograd markierten Neuronen im Ganglion nodosum und im Ganglion jugulare.
- IV. Immunhistochemischer Nachweis von TH und NPY und mögliche Kokalisation in retrograd markierten Neuronen im Ganglion stellatum und im Ganglion cervicale superius.