

3 ERGEBNISSE

3.1 Lokalisation retrograd markierter Neurone

3.1.1 Retrogrades Tracing mittels Fast Blue

Der Tracer wurde in den rechten Hauptbronchus injiziert und konnte dort nach Tötung der Tiere nach 7 Tagen noch nachgewiesen werden. Die Verteilung des Tracers erstreckte sich über das gesamte Lungenparenchym bis zur Pleura viszeralis, wo er sich angesammelt zu haben schien (Abb.2a,b).

Der distale Anteil der Trachea war bei allen Tieren mit einer dünnen Schicht des Farbstoffes bedeckt. In der benachbarten Speiseröhre konnte kein Tracer nachgewiesen werden (Abb.2c).

3.1.2 Sensible Ganglien

Die sensiblen Vagusganglien, die als Komplex präpariert waren, wurden getrennt und anschließend ausgewertet. Als Vergleichsmöglichkeit wurde in einem der Fälle der Komplex als Ganzes belassen.

Zur Validierung der Methode wurde in einer ersten Durchsicht die retrograd markierten Neurone und ihr zahlenmäßiger Anteil zu den weiteren im Ganglion befindlichen Neuronen bestimmt.

Dazu wurde jeder vierte Serienschnitt verwendet.

Pro Schnitt fanden sich beim Ganglion nodosum und beim Ganglion juguare etwa 8 bis 14 retrograd markierte Nervenzellen. Damit hatten sie einen Anteil von ca. 5% an allen im Ganglion befindlichen Zellen. Die Ganglien der rechten Seite enthielten mit 6% gegenüber 4% auf der linken Seite etwas mehr retrograd markierte Zellen.

3.1.3 Sympathische Ganglien

Die Verteilung der retrograd markierter Neurone auf die einzelnen sympathischen Ganglien sah folgendermaßen aus: 59% der in die Lunge projizierenden Nervenzellen fanden sich im Ganglion stellatum und 41% fanden sich im Ganglion cervicale superius. Der Anteil der rechten Seite war mit 62% retrograd markierter Zellen höher als der Anteil der linken Seite mit 38% retrograd markierter Zellen.

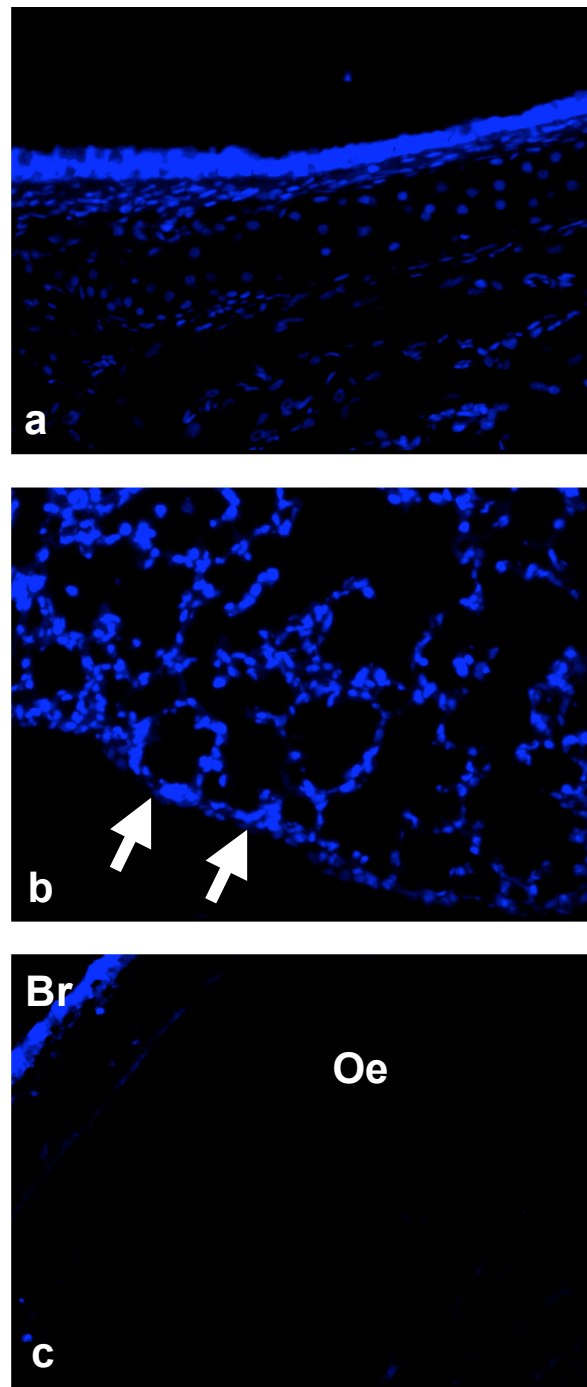


Abbildung 2: Verteilung des Tracers

a: Bronchuswand mit Epithel: Anreicherung von Fast Blue

b: Lungengewebe der rechten Lunge. Eine diffuse Verteilung von Fast Blue im Lungengewebe ist erkennbar; außerhalb der Pleuragrenze (Pfeile) keine Anreicherung von Fast Blue (x20)

c: Bronchuswand (Br) mit benachbarten Ösophagus (Oe)

3.2 Immunhistochemie retrograd markierter Neurone

3.2.1 Sensible Ganglien

Die in die Lunge projizierenden Neurone wurden mittels Tracer (FB) identifiziert. Eine Gesamtzahl von 1438 FB-positiven Zellen in den sensiblen Ganglien wurde auf NOS- und SP-Immunreaktivität untersucht.

Die Auswertung ergab folgende Kombinationen: immunreaktiv für SP (FB/SP+), immunreaktiv für NOS (FB/NOS+), immunreaktiv für beide Substanzen (FB/SP+/NOS+), keine Immunreaktivität für die untersuchten Substanzen (FB/SP-/NOS-).

SP ließ sich insgesamt zu 29 % in den sensiblen Ganglien nachweisen. Betrachtet man die einzelnen Ganglien, so lässt sich SP in 23% der Fälle im Ganglion nodosum nachweisen und in 33% der Fälle im Ganglion jugulare. Die im Komplex belassenen Neurone wiesen in 30% der Fälle Immunreaktivität für SP auf.

Davon ausschließlich SP-immunreaktiv waren 16% der Neurone des Ganglion nodosum, 22% des Ganglion jugulare und 20% des Komplexes.

NOS fand sich insgesamt zu 11% in den sensiblen Ganglien. Eine Betrachtung der einzelnen Ganglien ergibt 9% NOS-positive Neurone im Ganglion nodosum und 12% NOS-positive Neurone im Ganglion jugulare. Die im Komplex ausgewerteten Neurone zeigten in 13% Immunreaktivität für NOS.

Ausschließlich NOS-immunreaktiv waren 2% der Neurone im Ganglion nodosum, 1% im Ganglion jugulare und 3% im Komplex.

Eine Kolo-kalisation von SP und NOS wurde in 8-10% der Fälle festgestellt.

Parallel zu ihrem Vorkommen in Neuronen sensibler Vagusganglien konnte Immunreaktivität für SP und NOS in Nervenfasern mit Projektion zu den unteren Atemwegen nachgewiesen werden.

In der Tabelle 5 ist die Anzahl der retrograd markierten Neurone in den jeweiligen Ganglien sowie die Verteilung der untersuchten Mediatoren/Transmitter aufgeführt.

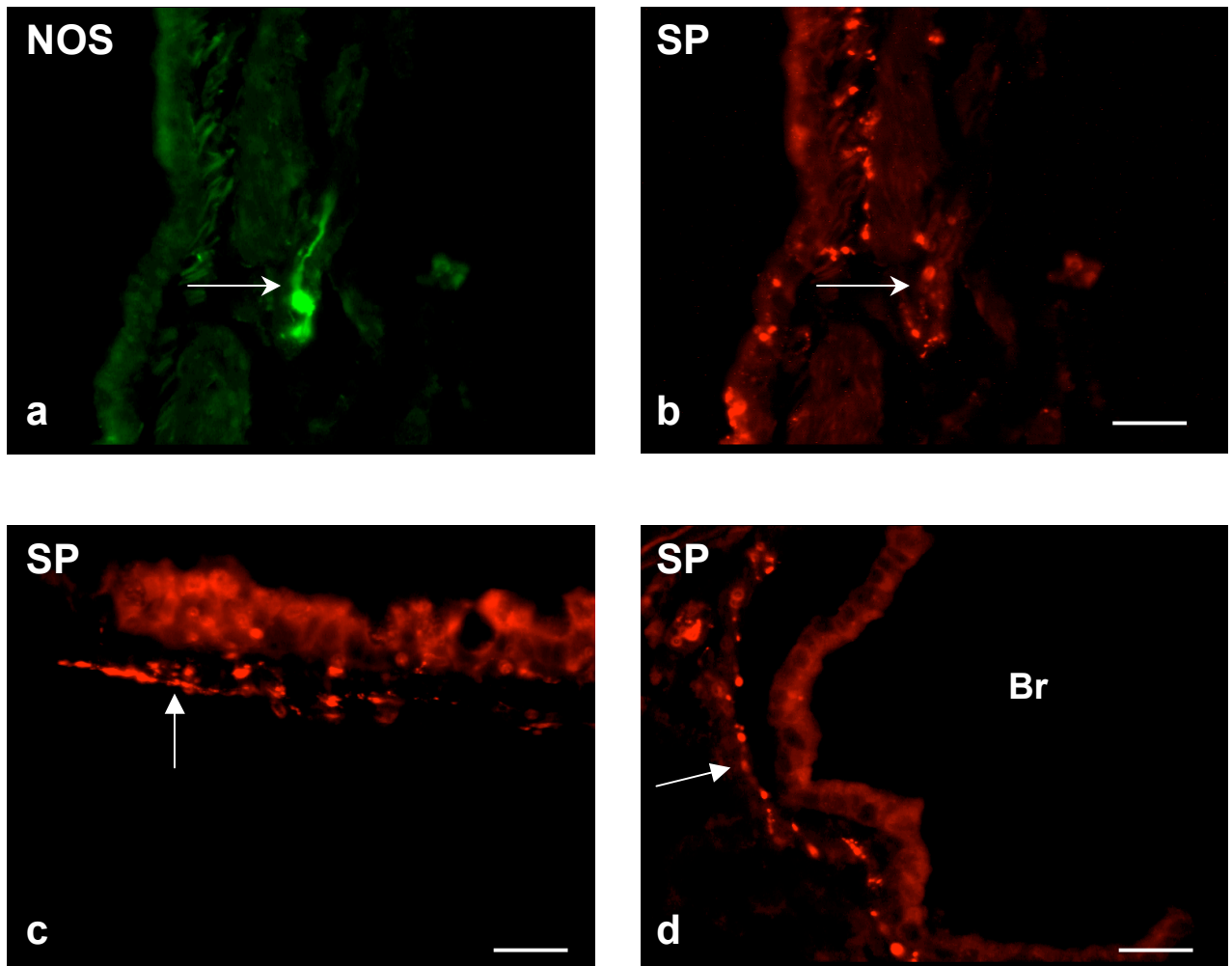


Abbildung 3: SP- und NOS- Immunreaktivität in Nervenfasern der unteren Atemwege der Ratte

a,b: Korrelation von SP- und NOS- Immunreaktivität in Nervenfasern, glatte Muskulatur eines Bronchus

c,d: SP-Immunreaktivität in Nervenfasern entlang des Epithels (c) eines Bronchus und (d) eines Bronchiolus (Br).

Balken = 40 μ m

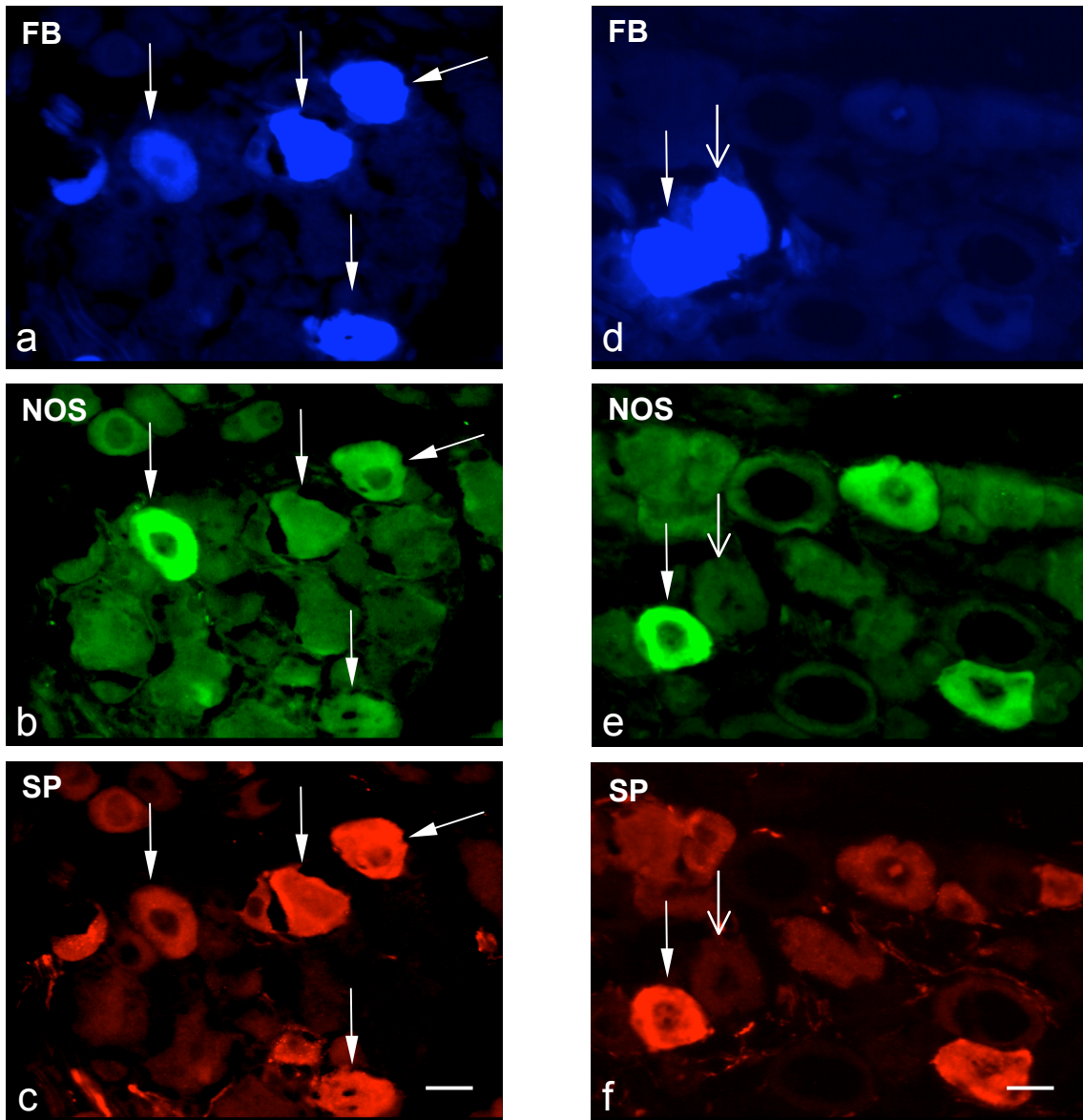


Abbildung 4: Korrelation von SP- und NOS-Immunreaktivität in retrograd markierten Ganglienzellen des Ganglion jugulare/ Ganglion nodosum der Ratte

a,b,c: retrograd markierte Neurone zeigen Immunreaktivität sowohl für NOS wie auch für SP (Kolokalisation)

d,e,f: retrograd markiertes Neuron zeigt keine Immunreaktivität weder für NOS noch für SP; retrograd markiertes Neuron zeigt Kolokalisation von NOS und SP

Kolokalisation: ausgefüllte Pfeilspitze

Keine Immunreaktivität für NOS/SP: offene Pfeilspitze

Balken = 20 µm

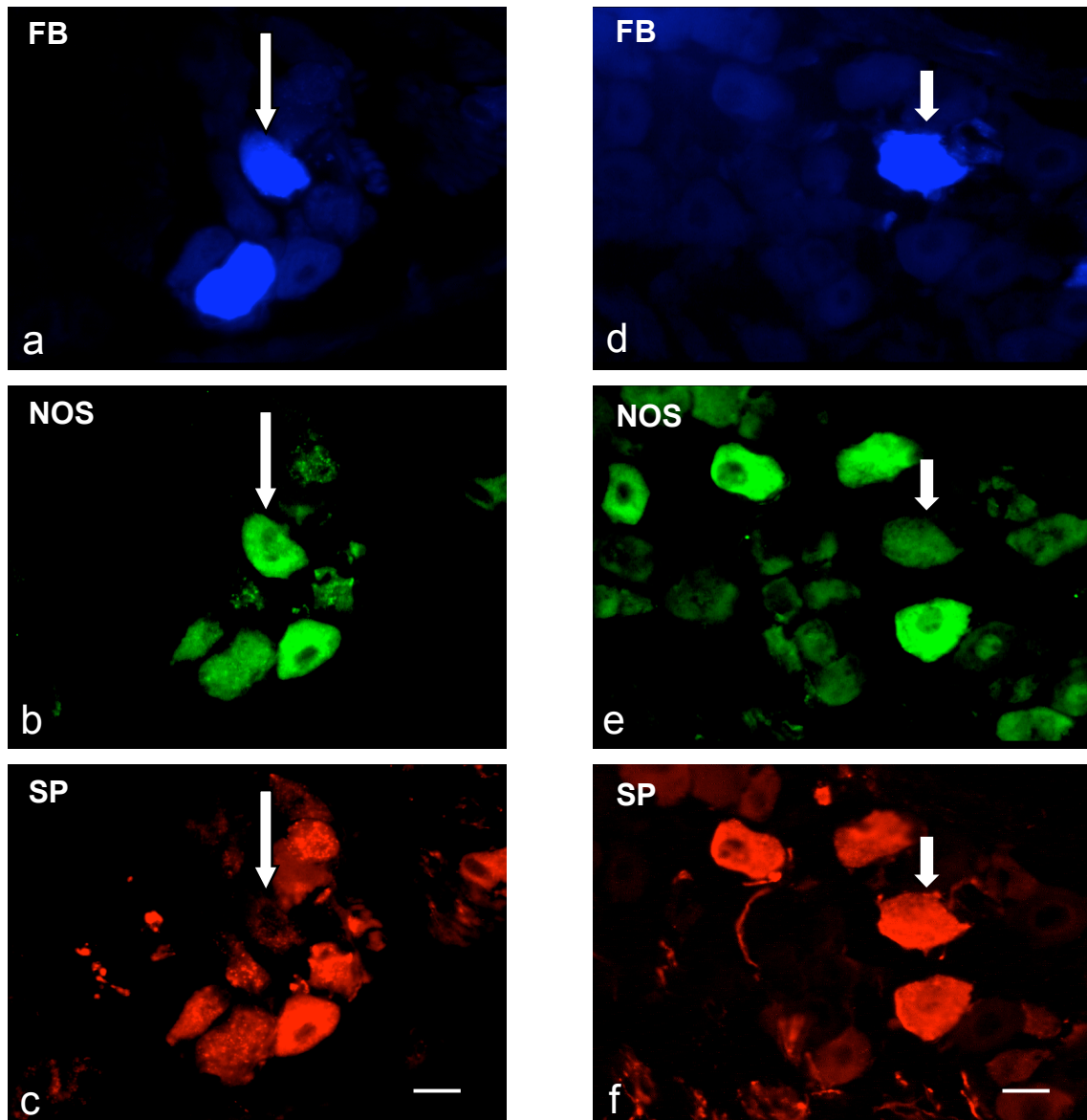


Abbildung 5: Korrelation von SP- und NOS-Immunreaktivität in retrograd markierten Ganglienzellen des Ganglion jugulare/Ganglion nodosum der Ratte

a,b,c: retrograd markiertes Neuron zeigt Immunreaktivität für NOS, jedoch nicht für SP

d,e,f: retrograd markiertes Neuron zeigt Immunreaktivität für SP, jedoch nicht für NOS

Immunreaktivität für NOS: langer Pfeil

Immunreaktivität für SP: kurzer Pfeil

Balken = 20 μ m

Tabelle 5: Immunhistochemisches Verteilungsmuster von SP und NOS in retrograd markierten Neuronen der sensiblen Vagusganglien
Ganglion nodosum und Ganglion jugulare

Ganglien-ID	Ganglientyp	Inkubation	Zellen ges	nur FB	AK I	AK II	Kolok	SP%	NOS%	SP/NOS%	SPges	SPges%	NOSges	NOSges%
124/01(I)	JNC li	SP-NOS	109	83	14	4	8	13%	4%	7%	22	20,18%	12	11,01%
125/01(I)	JNC re	SP-NOS	281	177	66	8	30	23%	3%	11%	96	34,16%	38	13,52%
Summekomp			390	260	80	12	38				118		50	
Mwkomp								20%	3%	10%		30%		12,82%
156/01(II)	nodosum li	SP-NOS	62	36	19	1	6	30,65%	1,61%	9,68%	25	40,32%	7	11,29%
158/01(II)	nodosum re	SP-NOS	78	58	14	1	5	17,95%	1,28%	6,41%	19	24,36%	6	7,69%
249/01(III)	nodosum li	SP-NOS	107	88	10	1	8	9,35%	0,93%	7,48%	18	16,82%	9	8,41%
187/01(IV)	nodosum li	SP-NOS	13	10	2	1	0	15,38%	7,69%	0,00%	2	15,38%	1	7,69%
189/01(IV)	nodosum re	SP-NOS	136	100	20	0	16	14,71%	0,00%	11,76%	36	26,47%	16	11,76%
219/01(V)	nodosum re	SP-NOS	49	42	4	3	0	8,16%	6,12%	0,00%	4	8,16%	3	6,12%
Summenod			445	334	69	7	35				104		42	
Mwnod								16%	2%	8%		23%		9,44%
157/01(II)	jugulare li	SP-NOS	46	19	20	1	6	43,48%	2,17%	13,04%	26	56,52%	7	15,22%
159/01(II)	jugulare re	SP-NOS	167	115	35	0	17	20,96%	0,00%	10,18%	52	31,14%	17	10,18%
248/01(III)	jugulare li	SP-NOS	46	32	8	0	6	17,39%	0,00%	13,04%	14	30,43%	6	13,04%
186/01(IV)	jugulare li	SP-NOS	129	86	28	1	14	21,71%	0,78%	10,85%	42	32,56%	15	11,63%
188/01(IV)	jugulare re	SP-NOS	215	146	43	7	19	20,00%	3,26%	8,84%	62	28,84%	26	12,09%
Summejug			603	398	134	9	62				196		71	
Mwjug								22%	1%	10%		33%		12%

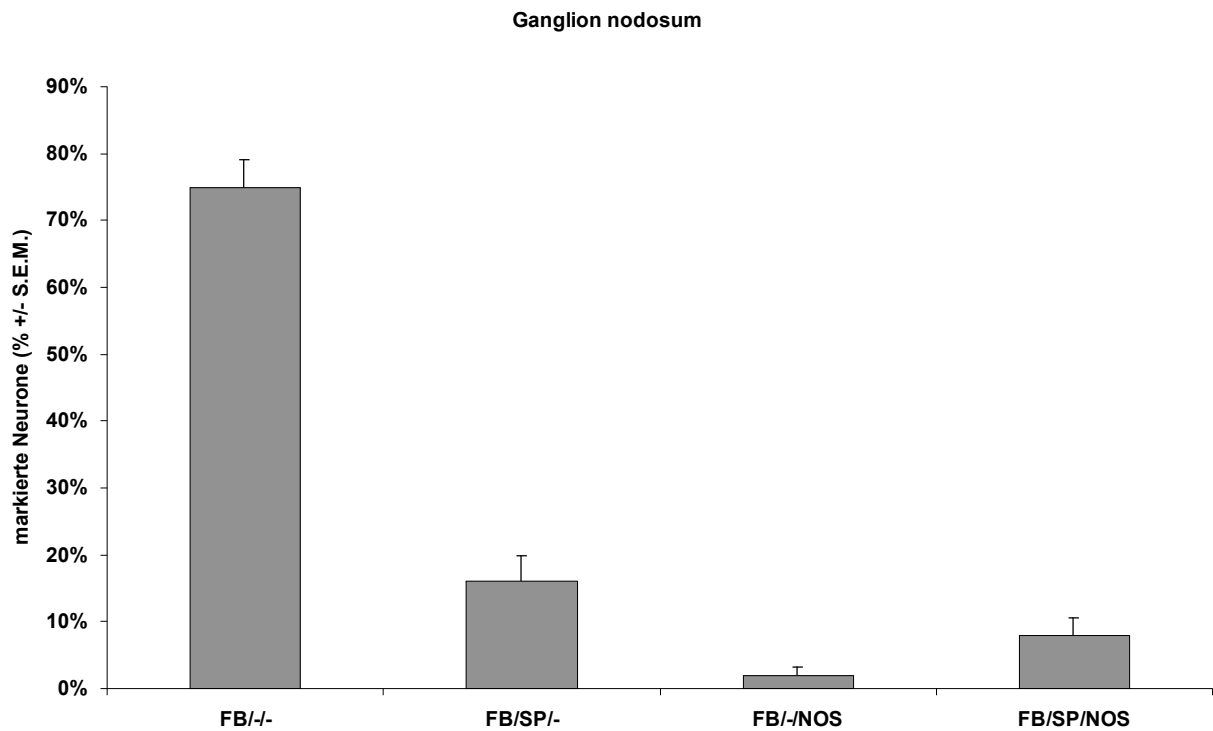


Abbildung 6:
 Neurochemische Charakterisierung der zur Lunge projizierenden Neurone im Ganglion nodosum.
 FB: Fast Blue markiert; SP± SP-immunreaktiv; NOS: NOS-immunreaktiv.
 Angabe in % ± S.E.M.

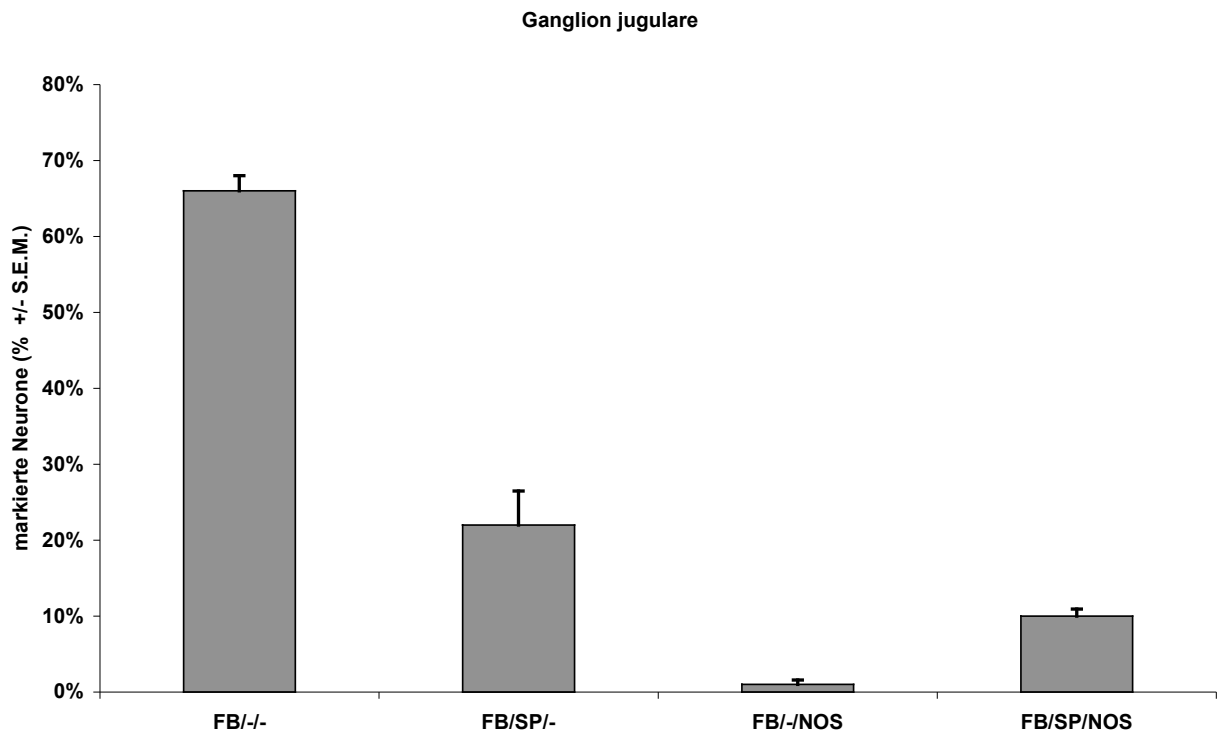


Abbildung 7:
 Neurochemische Charakterisierung der zur Lunge projizierenden Neurone im Ganglion jugulare.
 FB: Fast Blue markiert; SP: SP-immunreaktiv; NOS: NOS-immunreaktiv.
 Angabe in % +/- S.E.M.

3.2.2 Sympathische Ganglien

Die Auswertung der sympathischen Ganglien Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum ließ folgende Kombinationsmuster erkennen: immunreaktiv für TH, immunreaktiv für NPY, sowie TH und NPY kolokalisiert.

Eine Gesamtzahl von 4194 FB-positiven Zellen wurde nach Immunreaktivität für TH bzw. TH und deren Kolokalisation ausgewertet. In den retrograd markierten Neuronen konnten zu folgenden Anteilen die untersuchten Substanzen TH und NPY nachgewiesen werden:

TH-positiv waren 74% der Neurone des Ganglion cervicale superius und 81% des Ganglion stellatum, wobei alleinige Immunreaktivität für TH 31% der Neurone des Ganglion cervicale superius und 41% des Ganglion stellatum zeigten.

Eine Kolokalisation von TH mit NPY fand sich bei 43% der Neurone des Ganglion cervicale superius und bei 40% der Neurone des Ganglion stellatum.

Alleinige Immunreaktivität für NPY fand sich bei 8% der Neurone des Ganglion cervicale superius bei 5% der Neurone des Ganglion stellatum.

Insgesamt wurde somit NPY in 51% der Fälle im Ganglion cervicale superius und in 45% der Fälle im Ganglion stellatum nachgewiesen.

Parallel zu ihrem Vorkommen in Neuronen sympathischer Ganglien konnte Immunreaktivität für TH und NPY in Nervenfasern mit Projektion zu den unteren Atemwegen nachgewiesen werden.

In der Tabelle 6 ist die Anzahl der retrograd markierten Neurone in den jeweiligen sympathischen Ganglien sowie die Verteilung der Immunreaktivität für TH und NPY aufgeführt.

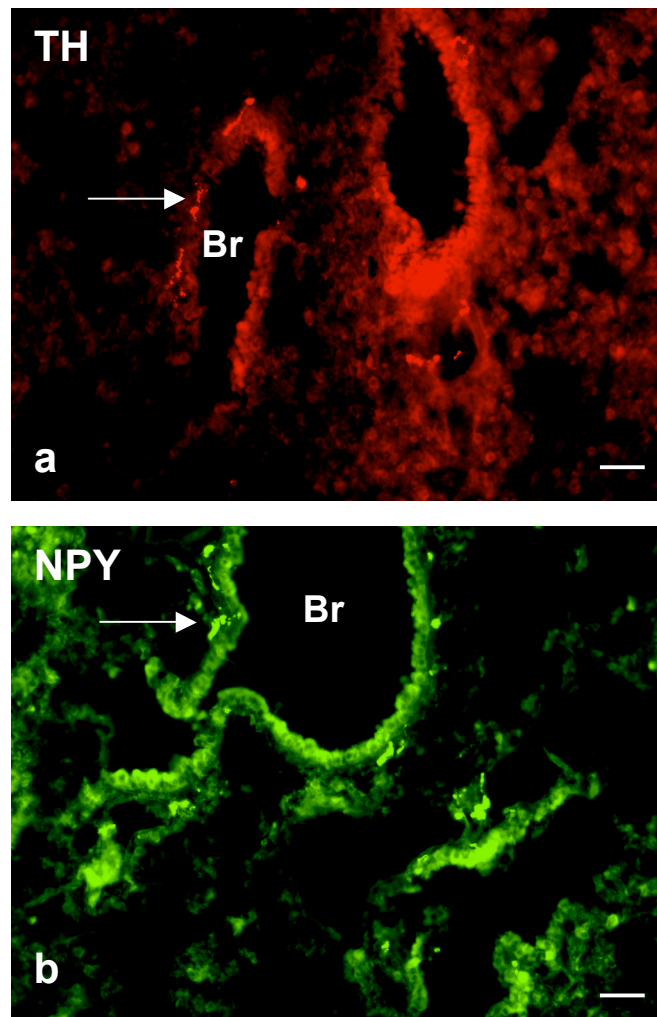


Abbildung 8:

TH- und NPY-Immunreaktivität in Nervenfasern der unteren Atemwege der Ratte

a: TH-immunreaktive Nervenfasern entlang eines Bronchiolus (Br)

b: NPY-immunreaktive Fasern entlang eines Bronchiolus (Br)

Balken = 40 μ m

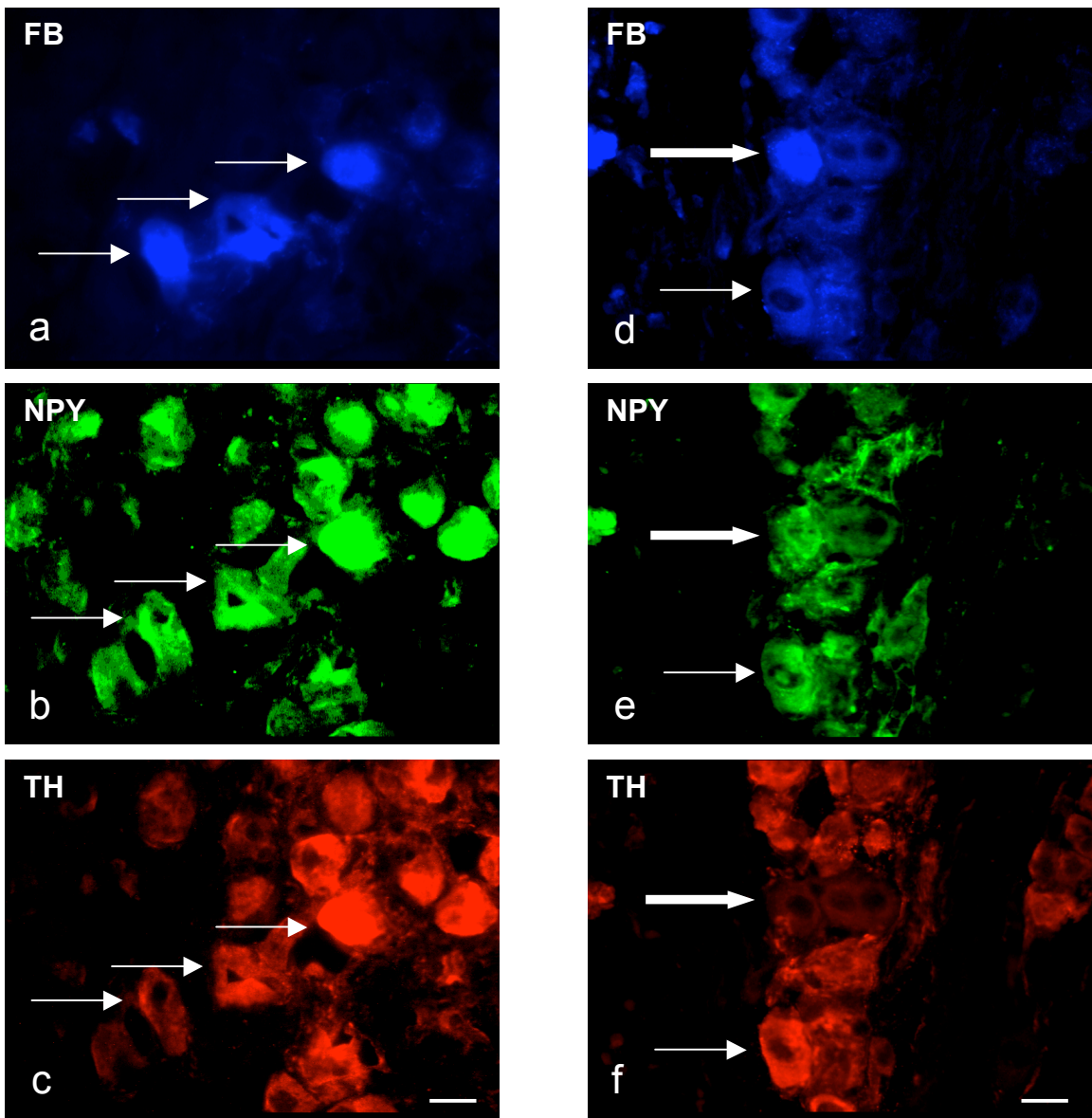


Abbildung 9: Korrelation von TH- und NPY- Immunreaktivität in retrograd markierten Neuronen des Ganglion stellatum

a,b,c: retrograd markierte Neurone zeigen Immunreaktivität sowohl für NPY wie auch für TH (Kolokalisation)

d,e,f: retrograd markiertes Neuron zeigt Immunreaktivität für NPY, jedoch nicht für TH (Blockpfeile)

Kolokalisation: dünne Pfeile

Immunreaktivität für NPY: Blockpfeil

Balken = 20 µm

Tabelle 6: Immunhistochemisches Verteilungsmuster von TH und NPY in retrograd markierten Neuronen der sympathischen Ganglien
Ganglion stellatum und Ganglion cervicale superius

Ganglien-ID	Ganglientyp	Zellen ges	nur FB	FB/TH	FB/NPY	FB/TH/NPY	FB%	TH%	NPY%	TH/NPY%	THges	THges%	NPYges	NPYges%
120/01(I)	stellatum re	227	33	91	10	93	15%	40%	4%	41%	184	81%	103	45%
121/01(I)	stellatum li	236	59	61	21	95	25%	26%	9%	40%	156	66%	116	49%
150/01(II)	stellatum re	353	52	161	19	121	15%	46%	5%	34%	282	80%	140	40%
151/01(II)	stellatum li	98	6	36	4	52	6%	37%	4%	53%	88	90%	56	57%
182/01(IV)	stellatum re	199	20	95	8	76	10%	48%	4%	38%	171	86%	84	42%
183/01(IV)	stellatum li	473	42	209	19	203	9%	44%	4%	43%	412	87%	222	47%
212/01(V)	stellatum re	170	36	50	17	67	21%	29%	10%	39%	117	69%	84	49%
242/01(III)	stellatum re	544	77	226	25	216	14%	42%	5%	40%	442	81%	241	44%
243/01(III)	stellatum li	168	7	93	5	63	4%	55%	3%	38%	156	93%	68	40%
Summe ste		2468	332	1022	128	986					2008		1114	
MW ste								41%	5%	40%		81%		45%
122/01(I)	G.cerv.sup. re	145	25	44	13	63	17%	30%	9%	43%	107	74%	76	52%
123/01(I)	G.cerv.sup. li	79	14	24	9	32	18%	30%	11%	41%	56	71%	41	52%
152/01(II)	G.cerv.sup. re	174	54	65	10	45	31%	37%	6%	26%	110	63%	55	32%
153/01(II)	G.cerv.sup. li	260	33	89	20	118	13%	34%	8%	45%	207	80%	138	53%
184/01(IV)	G.cerv.sup. re	414	55	137	27	195	13%	33%	7%	47%	332	80%	222	54%
185/01(IV)	G.cerv.sup. li	156	24	34	21	77	15%	22%	13%	49%	111	71%	98	63%
214/01(V)	G.cerv.sup. re	130	21	34	11	64	16%	26%	8%	49%	98	75%	75	58%
215/01(V)	G.cerv.sup. li	142	24	61	8	49	17%	43%	6%	35%	110	77%	57	40%
244/01(III)	G.cerv.sup. re	226	57	46	23	100	25%	20%	10%	44%	146	65%	123	54%
Summe G.c.s.		1726	307	534	142	743					1277		885	
MW G.c.s								31%	8%	43%		74%		51%

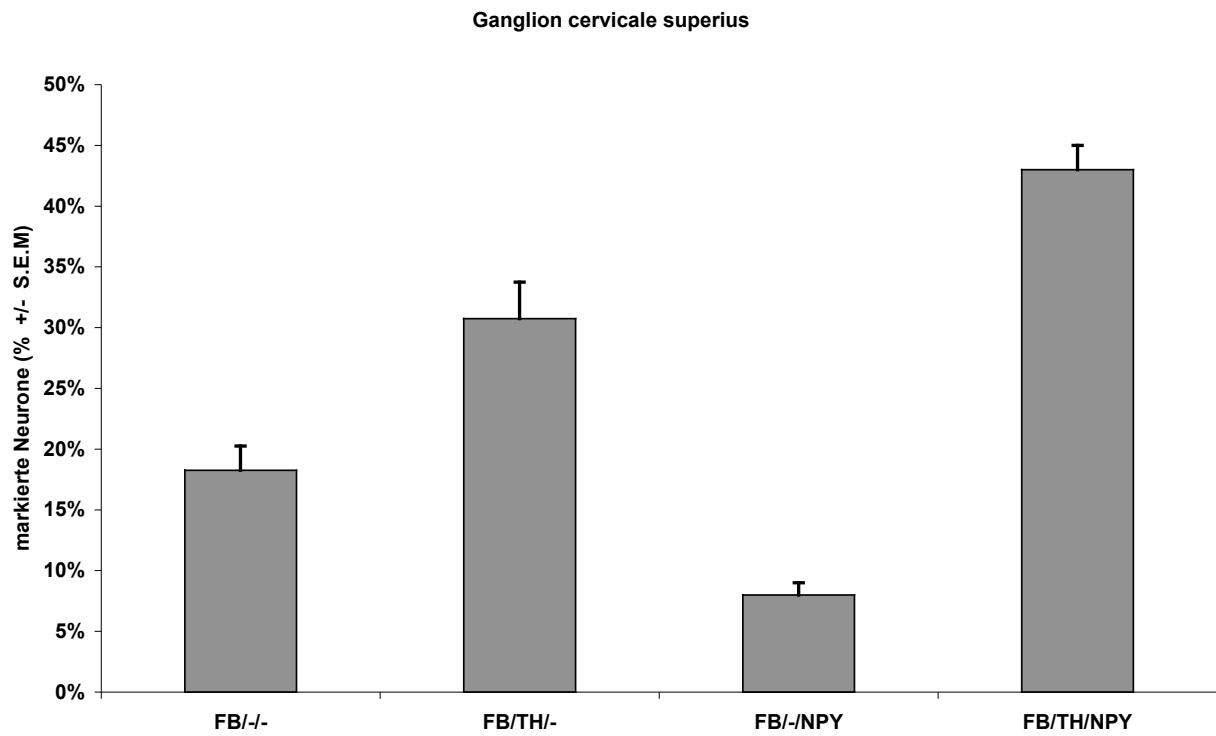


Abbildung 10:
 Neurochemische Charakterisierung der zur Lunge projizierenden Neurone im
 Ganglion cervicale superius.
 FB: Fast Blue markiert; TH: TH-immunreaktiv; NPY: NPY-immunreaktiv.
 Angabe in % +/- S.E.M.

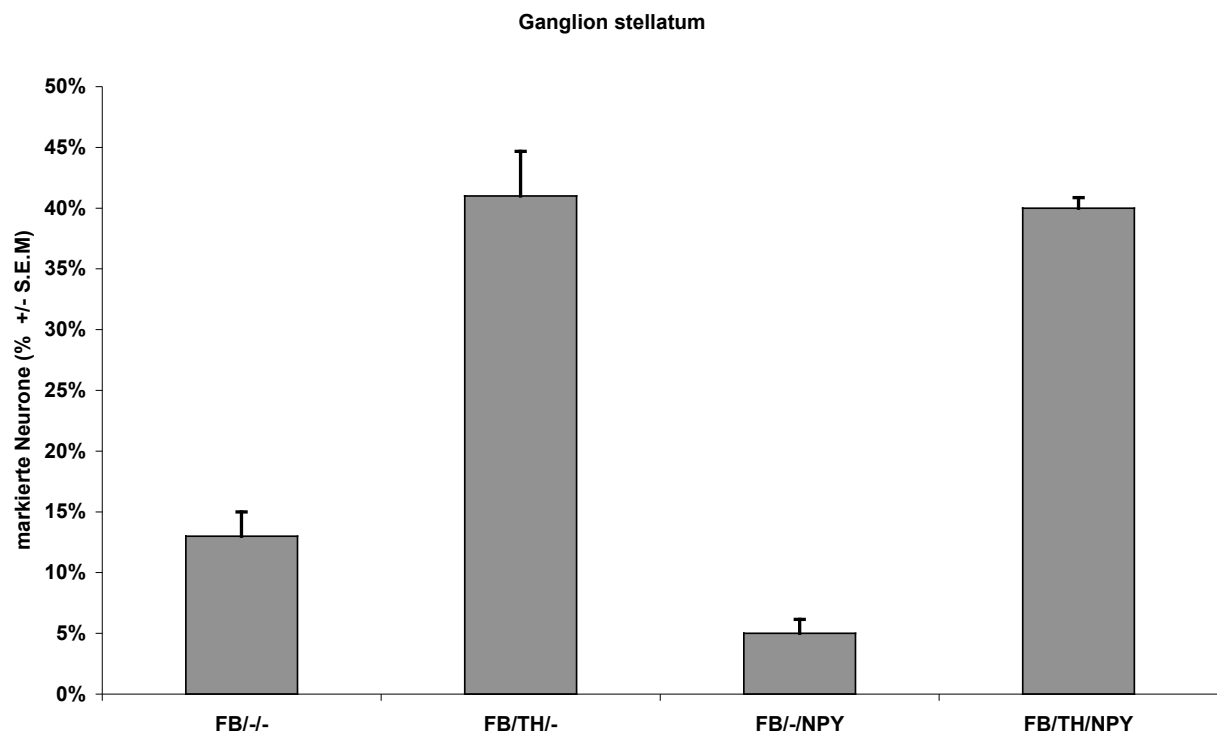


Abbildung 11:
 Neurochemische Charakterisierung der zur Lunge projizierenden Neurone im
 Ganglion stellatum.
 FB: Fast Blue markiert; TH: TH-immunreaktiv; NPY: NPY-immunreaktiv.
 Angabe in % +/- S.E.M.