

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Retrograde neuronale Markierung und Doppelimmunhistochemie

Das Wissen über die Innervation der inneren Organe hat in den letzten Jahren stark zugenommen und zur Entdeckung und Beschreibung verschiedener Neurotransmitter, Mediatoren und Neuropeptiden geführt. Obgleich ubiquitär im ganzen Organismus vertreten, lassen sich charakteristische Verteilungsmuster, ein „neurochemical coding“ für verschiedene Organe und Zellen erkennen (Klimaschewski et al. 1996).

Besonders spielen sie eine Rolle bei der neurogenen Entzündung im Gehirn, in der Lunge, im Dickdarm und in den Gelenken, wo sie modulierend, teils verstärkend, teils abschwächend eingreifen. Bei den erwähnten Transmittern und Mediatoren handelt es sich um unterschiedliche Moleküle – von einfacher Struktur, wie NO – bis hin zu komplexen Strukturen wie Polypeptiden. Sie beteiligen sich an der Steuerung einer Vielzahl von Funktionen unterschiedlicher Lokalisation, die in einem regulatorischen Netzwerk miteinander in Verbindung stehen. Der Komplexitätsgrad erhöht sich außerdem durch Speziesunterschiede, (Lundberg 1995) und es stellt sich die Frage, welcher Nutzen sich für Fragestellungen beim Menschen durch die an Labortieren gewonnenen Erkenntnissen ziehen lässt.

Die vorliegende Arbeit untersucht die sensible und die sympathische Innervation der Atemwege der Brown Norway Ratte mittels retrogradem Tracing. Wie in einer vorausgegangenen Arbeit an Mäusen beschrieben (Dinh et al. 2004, 2005) wurde in dieser Arbeit an Ratten der Tracer Fast Blue intraluminal in den rechten Hauptbronchus verabreicht. Immunhistochemische Untersuchungsmethoden erlauben den Nachweis und die Charakterisierung von NOS, SP, TH und NPY in den Perikaryen der zu den Atemwegen projizierenden Neuronen.

Arbeiten, die eine Charakterisierung der sensiblen wie auch sympathischen Innervation zum Inhalt hatten, sind bisher nur an Meerschweinchen und Mäusen durchgeführt worden (Kummer et al. 1992, Dinh et al. 2004, 2005).

Eine Arbeit über die Atemwegsinnervation der Ratte, die ebenfalls neuronale Markierung mit Doppelimmunhistochemie verband, untersuchte sensible vagale Neurone auf Immunreaktivität für CGRP (Springall et al. 1987).

## **4.2 Innervation der unteren Atemwege**

### **4.2.1 Sensible Ganglien**

Übereinstimmend mit einer von Springall 1987 durchgeführten Untersuchung an der Ratte (Springall et al. 1987) konnten in unserer Arbeit die sensiblen Vagusganglien, Ganglion nodosum und Ganglion jugulare, als Quelle der sensiblen Versorgung der unteren Atemwege identifiziert werden. Desweiteren zeigt unsere Arbeit, dass nach Applikation des neuronalen Tracers in den rechten Hauptbronchus die Ganglien nodosum und jugulare zu etwa 5% markierte Neurone enthalten.

Dies steht im Einklang mit zahlreichen Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen, aus denen hervorgeht, 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 und Lundberg 1984, Springall et al. 1987, Dey et al. 1990, Kummer et al. 1992).

In einer Untersuchung am Meerschweinchen konnte durch die Injektion eines Tracers (Fast Blue oder Fluoro-Gold) in die Trachea das Ganglion nodosum als die Hauptquelle (Ganglion nodosum 65%, Ganglion jugulare 35%) der sensiblen Innervation der Trachea identifiziert werden (Kummer et al. 1992). Obwohl der Tracer bei diesem Experiment bei Lungeninjektion in den rechten Hauptbronchus injiziert wurde, konnten markierte sensible Neurone des Nervus vagus zu 55% auf der rechten und zu 45% auf der linken Seite nachgewiesen werden.

Dass die Lunge sowohl vom linken als auch rechten Vagusnerven innerviert wird, konnte ebenfalls aus einer Untersuchungen an der Ratte mit Cholera-Toxin/Pseudorabies-Injektion in eine Lungenhälfte und der anschließenden Beobachtung einer Markierung gleicher Anteile von zentralen Vagusperikaryen auf beiden Seiten der Medulla im Hirnstamm geschlossen werden (Fontan et al. 2000).

Auch in einer Arbeit an der Maus wurden die sensiblen Vagusganglien, die hier im Komplex belassen waren, als Quelle sensibler Fasern in Trachea und Lunge identifiziert (Dinh et al. 2005).

### **4.2.2 Sympathische Ganglien**

Ausgehend von einem Degenerations-Experiment zur Untersuchung der sympathischen Innervation der Atemwege wurde dem Ganglion cervicale superius ein erheblicher Beitrag an der sympathischen Innervation der Trachea des Meerschweinchens zugewiesen (Smith und

Satchell 1985). Schon hier vermutete man eine weitere Quelle, nachdem nach Entfernung des Ganglion die noradrenerge Versorgung nicht gänzlich aufgehoben war. Später wurde durch retrogrades Anfärben das Ganglion stellatum als weitere Quelle der sympathischen Innervation der Trachea, insbesondere des distalen Abschnittes identifiziert (Kummer et al. 1992). In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass das Ganglion stellatum die Hauptquelle der sympathischen Innervation der Meerschweinchenlunge ist. In einer Untersuchung an der Maus wurden ebenfalls mit Hilfe neuronaler retrograder Anfärbung die Ganglien stellatum und cervicale superius als Quelle sympathischer Nerven der unteren Atemwege identifiziert. Hier fand sich die Mehrzahl der markierten Neurone im Ganglion cervicale superius (Dinh et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit an der Ratte konnte, wie beim Meerschweinchen, eine Mehrzahl von 59% der markierten Neurone im Ganglion stellatum gefunden werden; 41% fanden sich im Ganglion cervicale superius. Die Ganglien der ipsilateralen Seite (rechts) hatten mit 63% einen größeren Anteil als die der kontralateralen Seite (38%). Ähnlich war am Meerschweinchen eine mit 70% überwiegend ipsilateral versorgte Trachea beobachtet worden (Kummer et al. 1992).

### **4.3. Immunhistochemische Auswertung**

#### **4.3.1 Sensible Vagusganglien**

Tachykinine wie Substanz P und Neurokinin A sowie Calcitonin gene-related peptide (CGRP) mit ihrer entzündungsfördernden Wirkung in den Atemwegen werden von sensiblen Nervenendigungen freigesetzt, deren Ursprungsneurone in sensiblen Vagusganglien und in Rückenmarksganglien liegen (Kummer 1992).

Sensible Vagusganglien, die die Atemwege innervieren, wurden seltener auf ihren Transmitter- und Neuropeptidgehalt untersucht als die Rückenmarks-Ganglien (Kummer 1992).

Vergleichende Untersuchungen, welche die Topographie immunreaktiver Neurone in Vagusganglien behandeln, konnten einen qualitativen wie auch quantitativen Unterschied im Neuropeptidgehalt feststellen, machen aber keine Aussage über eine Projektion der immunreaktiven Neurone in die Atemwege (Helke und Hill 1988, Helke und Niederer 1990).

Die vorliegende, an Brown-Norway Ratten durchgeführte Arbeit untersucht ähnlich wie vorangegangene Studien an Meerschweinchen und Maus die retrograd markierten Zellen in sensiblen Vagusganglien auf Immunreaktivität für SP bzw. NOS und deren Kolokalisation.

#### 4.3.1.1 Retrograd markierte Neurone mit SP+(/NOS-) Immunreaktivität

In vorangegangenen Studien an Meerschweinchen und Ratte, die Immunhistochemie mit retrogradem Tracing verbanden, wurde die Beobachtung gemacht, dass SP-, NKA- und CGRP-immunreaktive Neurone mit Projektion zur Trachea und Lunge hauptsächlich im Ganglion jugulare lokalisiert sind. Obwohl das Ganglion nodosum einen erheblichen Beitrag an der sensiblen Innervation leistet, konnte keine (<1%) Immunreaktivität für Tachykinine in den dort befindlichen sensiblen Neuronen nachgewiesen werden (Springall et al. 1987, Kummer et al. 1992, Hunter und Udem 1999).

So zeigen die am Meerschweinchen durchgeführten Studien, dass etwa die Hälfte (49%) der Neurone des Ganglion jugulare, die die Atemwege innervieren, SP-immunreaktiv sind. Im Gegensatz dazu sind 99% der Neurone im Ganglion nodosum, die in die Lunge projizieren, negativ für diese Neuropeptide (Kummer et al. 1992, Hunter und Udem 1999).

Während die in der vorliegenden Arbeit an der Ratte gemachte Beobachtung von 33% SP-immunreaktive Neurone im Ganglion jugulare mit vorherigen Beobachtungen in etwa übereinstimmt, weicht unsere Beobachtung von 23 % SP-immunreaktive Neurone im Ganglion nodosum von Ergebnissen in vorangegangenen Studien an Meerschweinchen ab.

Diese Diskrepanz könnte Spezies bedingt sein. Ein anderes an der Ratte durchgeführtes Experiment untersuchte Neurone sensibler Vagusganglien mit Projektion zu den Atemwegen auf Immunreaktivität für CGRP. Hier wurden 50% immunreaktive Neurone im Ganglion jugulare gegenüber 1% immunreaktive Neurone im Ganglion nodosum gefunden. Jene Neurone waren nicht immunhistochemisch auf SP hin untersucht worden, sodass eine direkte Vergleichbarkeit nicht gegeben ist.

Experimentelle Arbeiten, die Effekte der allergischen Atemwegsentzündung auf die Tachykininbiosynthese untersuchten, konnten eine Veränderung im Ganglion nodosum bezüglich SP-haltiger Neurone beobachten. So stieg die Anzahl der Tachykinin-immunreaktiven Neurone insgesamt bei ovalbumin-sensibilisierten und provozierten Meerschweinchen um 25%. Durch retrogrades Tracing konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil der SP-/NKA-immunreaktiven Neurone im Ganglion nodosum mit Projektion zu den Atemwegen von 0,2% bei Kontrolltieren auf 10,4% bei den behandelten Tieren nach 24 Stunden nach Allergen-Provokation stieg. Eine Induktion des Tachykinin-Genes (PPT-A) konnte für die vermehrte Peptid-Expression im Ganglion nodosum verantwortlich gemacht werden. 24 Stunden nach

inhalativer Allergenprovokation konnte mit Hilfe von Radioimmunoassay ein 3- bis 4-facher Anstieg von SP, NKA und CGRP in den Lungengeweben sensibilisierter Meerschweinchen gemessen werden (Fischer et al. 1996a).

Die Qualität der Nervenfasern, die von Neuronen der beiden Vagusganglien ausgehen, wurde ebenfalls untersucht und es stellte sich heraus, dass die für Tachykinine negativen Neurone des Ganglion nodosum alle (98%) positiv sind für Neurofilament (NF), einem Marker für myelinisierte (A-delta) Fasern (Riccio et al.1996). Man war davon ausgegangen, dass Tachykinine von Nervenendigungen unmyelinisierter sensibler C-Fasern freigesetzt werden, deren Zellkörper charakteristischerweise einen kleinen Durchmesser besitzen und im Ganglion jugulare liegen (Kummer et al. 1992, Riccio et al. 1996).

Eine Arbeit, die besonderes Augenmerk auf Phenotyp und Physiologie der neuropeptidproduzierenden Neurone richtete, postulierte unterschiedliche Synthesorte für Neuropeptide unter normaler und unter Entzündungssituation (Myers et al. 2002). In der Kontrollgruppe (normale Bedingung) zeigten Neurone des Ganglion nodosum, die einen großen Durchmesser haben und positiv für NF sind, keine Immunreaktivität für SP. Ein Tag nach Ovalbumin Challenge waren bei den sensibilisierten Tieren über 30% dieser Neurone immunoreaktiv für Substanz P und CGRP. Interessanterweise zeigte sich keine Veränderung hinsichtlich der Unempfindlichkeit gegenüber Capsaicin, obwohl die Allergen-Provokation eine SP-Synthese ausgelöst hatte. Dieses konnte auch durch einen Nachweis fehlender TRPV1-(Capsaicin) Rezeptoren auf ihren Nervenendigungen untermauert werden.

Neurone des Ganglion nodosum, die auf einen Stimulus hin SP produzieren, wurden auch in einer anderen Studie an den Atemwegen nachgewiesen. Nerve growth factor (NGF), eine Substanz, die zu den stärksten Induktoren und Regulatoren der Biosynthese von Tachykininen zählt, wurde in die Trachea des Meerschweinchens injiziert. Anschließend konnte eine erhöhte Expression von SP in Neuronen des Ganglions nodosum nachgewiesen werden (Hunter et al. 2000).

In einer Reihe von Untersuchungen an Tiermodellen mit geweblichen Entzündungsreaktionen bzw. mit Nervenläsion konnten Auswirkungen auf die Biosynthese sensibler Neuropeptide beobachtet werden. Eine erhöhte Neuropeptidsynthese wurde in Entzündungsmodellen der Gelenke (Weihe et al. 1988, Donnerer et al. 1992, Mapp et al. 1993, Ahmed et al. 1995), der Haut (Naukkarinen et al. 1989), des Gastrointestinaltraktes (Yamamoto et al. 1996) und der Blase (Callsen-Censic et al. 1997) nachgewiesen.

Auch beim Menschen konnte ein Anstieg von SP bei entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa (Keränen et al. 1995), Appendicitis (DiSebastiano et al. 1999) und rheumatischer Arthritis (Menkes et al. 1993) beobachtet werden. Ein in bronchoalveolarer Lavage gemessener SP-Gehalt war bei Patienten mit Asthma oder chronischer Bronchitis erhöht (Tomaki et al. 1995, Nieber et al. 1992).

#### **4.3.1.2 Retrograd markierte Neurone mit NOS+/SP+Immunreaktivität**

Eine Kolokalisation von SP und NOS und somit das gleichzeitige Vorkommen eines exzitatorischen e-NANC-Transmitters mit einem inhibitorischen i-NANC-Transmitter wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden. Etwa ein Drittel aller SP-immunreaktiven Neurone mit Projektion in die Atemwege zeigte auch Immunreaktivität für NOS.

Dabei stellt sich die Frage einer möglichen Interaktion der beiden eigentlich entgegengesetzt wirkenden Transmitter. In einer Untersuchung an RAR-Rezeptoren in der Meerschweinchenlunge konnte ein Einfluss von NO auf eine Substanz P-vermittelte RAR-Aktivierung beobachtet werden (Joad et al. 1997).

Wenige Arbeiten haben die Kolokalisation von SP und NOS bisher untersucht. In einer Arbeit über die sensible Innervation der unteren Atemwege der Maus wurde beobachtet, dass die Hälfte der SP immunreaktiven Neurone sensibler Vagusganglien auch immunreaktiv für NOS war (Dinh et al. 2005).

Bei Untersuchungen vagaler Afferenzen der Trachea des Meerschweinchens hingegen gelang in NOS-immunreaktiven Neuronen kein Nachweis von SP (Fischer et al. 1996b).

In den menschlichen Atemwegen konnte in einem Großteil der Neurone sensibler Vagusafferenzen entweder SP oder NOS nachgewiesen werden; ein kleiner Teil zeigte Doppelimmunfluoreszenz (Fischer und Hoffmann 1996).

In sensiblen Ganglien (Ganglion nodosum, Spinalganglien) der Ratte mit Projektion zu Bauchorganen (Magen) wurde mittels NADPH-Diaphorase Technik eine Kolo-kalisation von SP und NO nachgewiesen (Aimi et al. 1991).

#### **4.3.1.3 Retrograd markierte Neurone mit NOS+(/SP-) Immunreaktivität**

In den sensiblen Vagusganglien konnte in der vorliegenden Arbeit ein Anteil von 10,7 % NOS-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Hierbei zeigen sich keine markanten Unterschiede zwischen Ganglion nodosum und Ganglion jugulare, sowie den im Komplex ausgewerteten Neurone. Ausschließlich NOS-positiv sind 2,4% der Neurone, was etwa einem fünftel aller NOS-positiven Neurone entspricht. In Untersuchungen beim Meerschweinchen reichte der Anteil NOS-immunreaktiver Neurone in sensiblen Vagusganglien von 5-10% im Ganglion nodosum, bis 20% im Ganglion jugulare. In diesen Neuronen konnte keine Immunreaktivität für SP nachgewiesen werden (Fischer et al. 1996b). Die an der Maus gefundenen 15% alleiniger Immunreaktivität für NOS in den als Komplex ausgewerteten sensiblen Vagusganglien liegen ebenfalls in diesem Bereich (Dinh et al. 2005). Damit scheint bei der Ratte der prozentuale Anteil NOS-positiver, SP- negativer Neurone etwas kleiner zu sein als bei Maus und Meerschweinchen. Wenn man die Gesamtzahl der NOS-positiven Neurone jedoch betrachtet, sind sie mit Maus und Meerschweinchen vergleichbar. So kann man vielleicht eher von einem erhöhten Anteil der zusätzlich für SP positiven NOS-immunreaktiven Neurone in den untersuchten Ratten sprechen, als dass man davon ausgeht, dass ein kleinerer Anteil mit alleiniger NOS- Immunreaktivität vorhanden ist.

#### **4.3.1.4 Retrograd markierte Neurone ohne NOS/SP-Immunreaktivität**

Im Schnitt konnte in 70% der retrograd markierten Neurone der sensiblen Vagusganglien weder Immunreaktivität für SP noch für NOS nachgewiesen werden. Es bleibt offen, welche Neuromediatoren neben den bekannten sensiblen Transmittern Aspartat und Glutamat in diesen zur Lunge projizierenden Ganglienzellen enthalten sind. Eine Übersicht über mögliche Transmitter in sensiblen Neuronen und ihre Rezeptoren gibt eine Arbeit von Belvisi (Belvisi 2003). Als Beispiele werden u.a. Opiode, GABA und NPY genannt.

### **4.3.2 Sympathische Ganglien**

Hinweise auf die Kolokalisation von Katecholaminen und NPY in sympathischen Fasern, welche die unteren Atemwege innervieren, gaben Degenerations-Experimente an Meerschweinchen und Ratten. Die Zahl der NPY-immunreaktiven Nervenfasern nahm nach der Behandlung mit einem Neurotoxin für noradrenerge Fasern ab (Uddman et al. 1984).

Arbeiten, die die sympathische Innervation der Atemwege qualitativ und quantitativ hinsichtlich des Neuromediatorgehalts der Neurone untersuchten, sind bisher an Meerschweinchen und Maus durchgeführt worden. In beiden Species konnte das alleinige Vorkommen von TH und NPY sowie deren Kolokalisation in den sympathischen Ganglien, Ganglion stellatum und Ganglion cervicale superius, beobachtet werden (Kummer et al. 1992, Dinh et al. 2004). Sich daraus ergebende Kombinationen sind: FB/TH+/NPY-, FB/TH+/NPY+, FB/TH-/NPY+ und FB/TH-/NPY-.

#### **4.3.2.1 Retrograd markierte Neurone mit TH+/(NPY-)Immunreaktivität**

In der vorliegenden Arbeit wurde in 36% aller retrograd markierter Neurone der untersuchten sympathischen Ganglien Immunreaktivität für TH aber nicht für NPY nachgewiesen. Dieses ist mit am Meerschweinchen gemachten Beobachtungen vergleichbar, wo TH-immunreaktive Neurone ohne Immunreaktivität für NPY den zweitgrößten Anteil an allen retrograd markierten Neuronen stellten (Kummer et al. 1992). Bei Untersuchungen an der Maus hingegen hatten TH-positive, NPY-negative Neurone mit 56% den größten Anteil an allen retrograd markierten Neuronen in den untersuchten sympathischen Ganglien (Dinh et al. 2004). Betrachtet man die Gesamtzahl aller TH-positiven Neurone, also sowohl solche mit und solche ohne zusätzliche NPY-Immunreaktivität, dann kommt man auf 74% für das Ganglion cervicale superius und auf 81% für das Ganglion stellatum. Diese an der BN-Ratte erhobenen Werte liegen etwas niedriger als die bei Meerschweinchen und Maus gefundenen, bei denen in nahezu allen (94-100%) sympathischen Neuronen mit Projektion in die Trachea bzw. in die unteren Atemwege Immunreaktivität für TH nachweisbar war.

#### **4.3.2.2 Retrograd markierte Neurone mit TH+/NPY+Immunreaktivität**

In den untersuchten sympathischen Ganglien der BN-Ratte konnten wir in über der Hälfte der TH-immunreaktiven, retrograd markierten Neurone auch Immunreaktivität für NPY nachweisen. Damit haben bei der BN-Ratte, wie auch beim Meerschweinchen (Kummer et al.1992), Neurone mit einer Kolokalisation von TH und NPY den größten Anteil an den retrograd markierten Neuronen im Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum. In der Maus war der Anteil der Neurone, in denen immunhistologisch sowohl TH als auch NPY nachgewiesen werden konnte, an den gesamten TH-immunreaktiven Neuronen etwas kleiner als bei Meerschweinchen und BN-Ratte. Bezogen auf die Gesamtheit der retrograd markierten Zellen in den sympathischen Ganglien standen Neurone mit Immunreaktivität für TH aber nicht für NPY bei der Maus, anders als bei Meerschweinchen und BN-Ratte, an erster Stelle (Dinh et al. 2004).

#### **4.3.2.3 Retrograd markierte Neurone mit NPY+(/TH-) Immunreaktivität**

Den kleinsten Anteil an retrograd markierten Zellen haben mit 5% im Ganglion stellatum und 8% im Ganglion cervicale superius Zellen, die immunreaktiv für NPY aber nicht immunreaktiv für TH waren. Dieses deckt sich mit bei Meerschweinchen und Maus gemachten Beobachtungen, wo katecholaminnegative Neurone mit NPY-Immunreaktivität die kleinste Fraktion stellten; bei der Maus lag der Anteil unter 1%.

Für diese katecholamin-negativen Neurone wurde eine Kolokalisation von NPY mit VIP angenommen. So wurde in einer Untersuchung am Meerschweinchen VIP in katecholaminnegativen/NPY-immunreaktiven Neuronen sympathischer Ganglien von Kontrolltieren gefunden (Kummer et al. 1992). In einer weiteren Untersuchung, die sich mit der sympathischen Innervation der Meerschweinchentrachea befasste, gelang es, VIP in katecholaminnegativen sympathischen Neuronen mit Projektion zu den Atemwegen nachzuweisen (Bowden und Gibbins 1992).

Da in der vorliegenden Arbeit VIP nicht untersucht wurde, bleibt offen, ob NPY-immunreaktive/TH-negative Neurone sympathischer Ganglien der BN-Ratte VIP enthalten.

#### **4.3.2.4 Retrograd markierte Neurone ohne TH/NPY-Immunreaktivität**

Ein kleiner Teil von 13% im Ganglion stellatum und 18% im Ganglion cervicale superius ist weder für NPY noch für TH immunreaktiv. Damit ist der Anteil von Neuronen, in denen weder Immunreaktivität für NPY noch für TH nachgewiesen werden konnte, an allen retrograd markierten Neuronen in der BN-Ratte größer als in der Maus, wo 6% im Ganglion stellatum und 1% im Ganglion cervicale superius gefunden wurden. Im Meerschweinchen ließen sich gar keine doppelt negativen Neurone in den untersuchten sympathischen Ganglien nachweisen. Weiterhin konnte dort die Beobachtung gemacht werden, dass Neurone der sympathischen Ganglien, Ganglion stellatum und Ganglion cervicale superius, entweder immunreaktiv für TH oder für VIP waren, also eine komplementäre Verteilung aufwiesen (Kummer et al. 1992). Sympathische Ganglien des Meerschweinchens wurden immunhistochemisch neben VIP auch auf NO untersucht. Dabei fanden Fischer und Mitarbeiter NOS-positive Fasern in sympathischen Ganglien, die die Atemwege von Meerschweinchen versorgen (Fischer et al. 1996b). Ein großer Teil dieser Fasern zeigte keine Immunreaktivität für TH, war also ebenfalls katecholaminnegativ. Die Frage, welche anderen Neuromediatoren sich neben TH und NPY in sympathische Ganglien befinden, muß offen bleiben und bedarf weiterer Untersuchungen.