

3 ERGEBNISSE

Mittels NADPH-Diaphorase-Reaktion und gegen NOS-I gerichteter Antikörper konnten bei beiden Methoden übereinstimmend positive von nicht markierten Neuronenpopulationen in der Schildkröte *Trachemys scripta elegans* unterschieden werden.

Die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode und die indirekte Immunzytochemie mittels fluoreszierend-markierter Antikörpern erbrachten identische neuronale Markierungen.

Mit Levamisol (als Inhibitor der alkalischen Phosphatase) präinkubierte oder gleichzeitig mit der NADPH-Nitroblau-Tetrazolium-Lösung inkubierte Schnitte zeigten keine differierenden Markierungen.

In den Negativ-Kontrollen der indirekten Immunfluoreszenz ohne Primär- und Sekundärantikörper konnte eine schwache farblich untypische Markierung an der Muskularis von Blutgefäßen und im Leberparenchym ausgemacht werden. Die Negativ-Kontrollen zu dieser Methode ohne Primärantikörper zeigten keine weiteren Signale.

Die Negativ-Kontrollen ohne Primärantikörper zur PAP zeigten bei intravasculär verbliebenen Erythrozyten zum Teil eine schwache positive Reaktion.

Mit Nitroarginin, einem Hemmstoff der Stickoxid-Synthase, präinkubierte Schnitte, die anschliessend der NADPH-Histochemie zugeführt wurden, zeigten sich keine differierenden Markierungen.

Da im Vordergrund der Arbeit NOS im Nervengewebe steht, ist die folgende Beschreibung auf die Innervation beschränkt. Es wurde auch NOS nicht-neuronal gefunden, dies wird im letzten Abschnitt (3.10) kurz erwähnt.

3.1 Ganglien

Autonome und sensible Ganglien von *Trachemys scripta elegans* weisen Stickoxidsynthase-Immunreaktivität (NOS-i) und NADPH-Diaphorase-Enzymaktivität

(NADPHd) in Kolokalisation auf. Die positiven Ganglienzellen zeigen eine unterschiedliche Intensität in der Diaphorase-Reaktivität, die sich in der Antikörpermarkierung dadurch bestätigt, dass nur schwach positive Zellen nicht markiert werden. Die markierte Subpopulation zeigt keine morphologischen Unterschiede zu den in der Umgebung liegenden Nervenzellen.

3.1.1 Sensorische Ganglien

3.1.1.1 Ganglion trigeminale

Der Nervus trigeminus entspringt ventrolateral aus dem rostralen Anteil des Rautenhirns. Der einheitliche Nervenstrang verläuft im Schädelinnern nur kurz und gelangt zum grossen Ganglion trigeminale, das sich zwischen M. retractor bulbi, der Ohrkapsel und der Vena capitis nach lateral ausdehnt, wobei sich der laterale Teil des Ganglions im Cavum epiptericum befindet. Das Ganglion enthält neben unmarkierten Neuronen einzelne NADPH-diaphorase-positive/Antikörper-markierte Nervenzellen (Abb. 1A, 1B; 2; 3). Letztere sind bis auf wenige Ausnahmen gehäuft im proximalen Abschnitt um die Austrittsstelle des N. trigeminus lokalisiert. Am Ort der Entstehung der drei Hauptäste des Nervs befinden sich dagegen nur sporadisch positiv markierte Nervenzellen im Ganglion.

3.1.1.2 Spinalganglien

In den untersuchten 7. und 8. Spinalganglien (C7-9 Plexus brachialis) befinden sich nur vereinzelt Ganglienzellen mit Antikörpermarkierung / Diaphorase-Enzymaktivität (Abb. 4A, 4B).

3.1.2 Parasympathische Kopfganglien

3.1.2.1 Ganglion palatinum

Der Ramus palatinus entspringt dem rostralen Abschnitt des Ganglion geniculi und verläuft durch die Fissura orbitalis. Er erreicht das in der Orbita gelegene Ganglion palatinum. Dieses ist latero-retrobulbär in unmittelbarer Nähe der Harder'schen Drüse lokalisiert. Die einzeln liegenden Ganglienzellen und Nervenfasern sind im Gegensatz zu den anderen Kopfganglien in einem losen Verbund organisiert und begleiten so das Drüsengewebe. Die größte Zellansammlung von etwa 10-15 Ganglienzellen findet sich auf dem medialen Orbitaboden. Alle Zellen des Ganglions zeigen positive Markierungen (Abb. 5A, 5B). In den untersuchten Schnittserien zeigen sowohl prä- als auch postganglionäre Fasern deutlich positive Markierungen in beiden Nachweismethoden.

3.1.2.2 Ganglion ciliare

Das Ganglion ciliare ist das kleinste untersuchte Kopfganglion. Es ist oval geformt und liegt zwischen den Bündeln des M. retractor bulbi und N. opticus. Neben unmarkierten Ganglienzellen finden sich antikörperbindende / Diaphorase-reaktive Neurone. Diese sind vermehrt im dorsocaudalen und ventrocaudalen Abschnitt des Ganglions als Anhäufung von einigen Neuronen lokalisiert (Abb. 6). In den daraus hervorgehenden Nervi ciliares konnten keine entsprechenden positiven Nervenfasern nachgewiesen werden.

3.2 Sympathische Ganglien

3.2.1 Ganglion cervicale

Das Ganglion cervicale ist bei *Trachemys* ein grosses im Bereich des Plexus brachialis liegendes Ganglion, aus dem u.a. das Herz und die Lunge mit sympathischen Fasern versorgt wird. Es fanden sich weder mit NADPHd noch in der Immunreaktion positive Markierungen.

3.3 Respiratorisches System

3.3.1 Larynx

Im Verlauf des Ramus laryngeus vagi befinden sich einige markierte Neurone und Nervenfasern innerhalb des Nervenbündels sowie in dessen direkter Nähe. In Längsschnitten erkennt man vereinzelt subepithelial gelegene markierte Nervenzellen. Im Bindegewebe zwischen M. arytenoideus, Stimmritze und Recessus piriformis sind einige vereinzelt liegende Neurone lokalisiert (Abb. 7A, 7B). An dem Übergang zur Trachea ist ein positiv markiertes kleines rundliches Ganglion lokalisiert. Markierte Fasern des N. laryngeus recurrens sind hier vermehrt zu finden.

3.3.2 Trachea

Zwischen den Knorpelspannen im muskulären Teil der Pars membranacea der Trachea liegen positiv markierte Nervenfasern. Die Perikaria befinden sich unregelmäßig verteilt am lateralen Rand der Trachea. Kräftige Nervenfaserbündel des N. laryngeus recurrens vagi mit einzelnen reaktiven Fasern verlaufen erst parallel zur Longitudinal-Achse der Trachea und

schwenken dann in horizontaler Richtung den Knorpelstangen zu (Abb. 8; 9A, 9B). Auf dem horizontalen Rand der Knorpelstangen kreuzen deren Aufteilungen als feinste positiv reagierende Fasern. Auch medial zwischen den trachealen Knorpelstangen und subepithelial sind vereinzelt markierte Neurone mit ihren Fortsätzen erkennbar. Die nitrorege Innervation der Trachea erscheint eher gering.

3.3.3. Lunge und Bronchus

In der ganzen Ausdehnung der Lunge sind Neurone der intrapulmonalen Ganglien NOS-i/NADPH-Diaphorase-markiert. Die in Hilusnähe lokalisierten Ganglien sind größer als die in der Peripherie gelegenen. Weiter distal finden sich die Ganglien vereinzelter und bestehen aus weniger Zellen (Abb. 10A, 10B und 11A, 11B). Die hilusnahen Ganglien bestehen aus 50-100 Neuronen. Sie sind unmittelbar basal um den Hauptbronchus in der Submucosa gelegen (Abb. 12). Die Muscularis der Bronchi ist von feinen Nervenfasern und wenigen markierten Nervenzellkörpern durchsetzt. Einzelne oder Gruppen von 2-4 reaktiven Neuronen sind sporadisch im Bindegewebe des Lungenparenchyms lokalisiert. Dabei werden viele reaktive Neurone im Verlauf der Äste des Nervus vagus sichtbar. Es finden sich auch häufig positiv markierte Nervenzellen in der Nähe von Blutgefäßen.

3.4 Verdauungstrakt

Im gesamten Gastrointestinaltrakt sind NOS-i/NADPH-Diaphorase-reaktive neuronale Zellkörper und Nervenfasern gefunden worden. Die Neurone stammen aus dem Plexus myentericus und submucosus. Dabei sind die Dichte sowie der Anteil der aus beiden Plexus stammenden Zellen unterschiedlich (Tab.).

3.4.1 Zunge

Der Mundboden von *Trachemys scripta elegans* enthält die Zunge und den Kehlkopf, die beide in einer horizontalen Ebene angeordnet sind. Die Glottis laryngea liegt dabei im ventralen Pharynx eingebettet. Vom Zungenrund bis zur Zungenspitze sind positiv markierte Neurone zu finden. Die neuronalen Perikaria liegen meist in kleinen Gruppen um Muskelfaserzüge und in der Submucosa (Abb. 13A, 13B und 14A, 14B). Oft finden sich positiv markierte Zellen in unmittelbarer Nähe zum R. intermandibularis medius (N. V3), der die Schleimhaut des Mundhöhlenbodens, die Mundbodendrüsen und die Zungenoberseite innerviert. Einzelne markierte Nervenzellen kommen im subepithelialen Bindegewebe dicht an das Epithel grenzend vor. In unmittelbarer Nähe einer Papille oder eines Geschmacksporus sind jedoch keine positiv markierten Strukturen gefunden worden. Nitrorege Nervenfasern und Neurone konnten auch in distalen Abschnitten der Zunge festgestellt werden, besonders im Verlauf des R. lingualis (N.IX).

3.4.2 Pharynx

Der Pharynx von *Trachemys scripta elegans* lässt makroskopisch wie histologisch keine feste Verbindung zur Skelettmuskulatur erkennen. Bereits makroskopisch sind rautenförmige Faltungen des Schlunds zu sehen. In der dorsalen wie in der ventralen Wandung dieses Pharynx sind nur einige NOS-i/NADPHd positive Neurone in der schmalen subepithelialen Schicht zu finden (Abb. 15A, 15B).

3.4.3 Oesophagus

Im Oesophagus befindet sich die größte Anzahl und die höchste Dichte von positiv

markierten Nervenfasern und Perikaria des Gastrointestinaltrakts. In Querschnitten des Organs erkennt man sehr viele markierte Nervenfasern (Abb. 16A, 16B; 17). In Längsschnitten konnten jedoch auch die neuronalen Zellkörper dargestellt werden. Dies ist durch die konstante parallel zum Verlauf des Darmrohres gelegene Ausrichtung der sehr schmalen Nervenzellkörper erklärbar, die in Querschnitten die Breite des Zellkörpers nicht erkennen lassen. Den Hauptanteil machen dabei die Zellen des Plexus myentericus aus. Auch in der Lamina propria des Oesophagus konnten sowohl bemerkenswert viele teilweise sehr feine Nervenfasern als auch erstaunlich viele neuronale Zellkörper lokalisiert werden.

3.4.4 Magen

Der Magen des untersuchten Reptils ähnelt dem eines Säugers sehr und lässt sich makroskopisch in Kardie, Korpus und Pars pylorica einteilen. In der Kardie sind im Gegensatz zum Oesophagus besonders die Zellen des Plexus submucosus, die in kleinen Ansammlungen von 4-5 oder einzeln vorkommen, gekennzeichnet. Die Ganglienzellen der Muscularis sind hier in wesentlich geringerer Zahl markiert vorzufinden. Im Corpus gastricus sind weniger Neurone markiert. Dies gilt besonders für die Zellen des Plexus myentericus (Abb. 18, 19). Im Antrum pylori steigt die Ganglienzelldichte der immunzytochemisch und enzymaktiven Neurone auf ihren höchsten Wert im gesamten Magen an. In diesem Abschnitt des Gastrointestinaltrakts stellen sich positiv markierte Neurone vor allem in der Lamina propria dar.

3.4.5 Dünndarm

Das wie bei Säugern gut abgrenzbare Duodenum zeigt den Hauptanteil der positiv dargestellten Zellen im Plexus submucosus. Deutlich erkennt man deren feines Netzwerk aus

Nervenfasern, das sich bis in die Lamina propria der Villi verästelt (Abb. 20A, 20B). Es finden sich wesentlich weniger enzymreaktive / antikörperbindende Neurone in der Lamina muscularis, jedoch viele Nervenfasern, die parallel zu ihr verlaufen. Ein großes Kollektiv Diaphorase-positiver / immunzytochemisch erkennbarer Ganglienzellen mit einem dichten neuronalen Netzwerk des Plexus myentericus befindet sich im Sphinter Oddi. Im Längsschnitt erkennt man deutlich das engmaschige Netzwerk von Nervenfasern und die Perikaria der Neuronenpopulation.

Die Organisation von positiv markierten Neuronen des Plexus submucosus ist im weiteren proximalen Dünndarm dem des Duodenum analog. Die Markierungen der Nervenfasern und Perikaria des Plexus myentericus zeichnen sich geringfügig verdichtet ab (Abb. 21).

Im distalen Dünndarm rekrutieren sich positive Nervenzellen in gleichen Teilen aus dem Plexus submucosus und myentericus. Die Ganglienzelldichte positiv-reagierender Neurone des proximalen Darmabschnitts setzt sich gleichbleibend fort.

3.4.6 Kolon

Im proximalen Kolon liegt übereinstimmend eine gleiche Anzahl von Neuronen im Plexus myentericus und submucosus vor. Im Kolon sigmoideum erhöht sich die Neuronendichte markierter Ganglienzellen. Das in die Kloake invaginierte Rektum zeigt positiv dargestellte Nervenzellen überwiegend im Mesenterium zwischen Kloake und Rektum sowie im Plexus myentericus (Abb. 22, 23). Im Plexus submucosus sind positive Markierungen vereinzelt zu finden.

3.4.7 Kloake

In der ausgedehnten Muscularis der Kloake finden sich zahlreiche große Ganglien von

10 und mehr Neuronen. Nervenzellen im Bereich der Submucosa und Serosa sind wenig dargestellt (Abb. 24).

3.4.8 Gallenblase, Gallengang

Die nitrege Innervation der Gallenblase ist sehr gering. Lediglich in der Ringmuskelschicht des Organs finden sich vereinzelt positiv markierte Neurone. Der Ductus choledochus ist mit einer sehr geringen Muskularis ausgestattet. Einzelne spezifische Markierungen sind im subepithelialen Bindegewebe und der Muskularis zu finden.

3.4.9 Leber

In keinem der untersuchten Tieren war eine Markierung im Leberparenchym nachweisbar.

3.5 Ableitende Harnwege

3.5.1 Niere

In der Niere ist keine nNOS-positive Innervation gefunden worden.

3.5.2 Harnleiter

Im Bindegewebe der Harnleiter ist lediglich eine spärliche Innervation zu

verzeichnen. Die dichte Innervation der in der Nähe lokalisierten Nebenniere bezieht den Ureter nicht mit ein.

3.5.3 Harnblase

In Submucosa und Muscularis der Harnblase sind NOS-i / NADPH-Diaphorase-positive Neurone lokalisiert. Überwiegend in der Muscularis stellt sich ein feines Netzwerk von markierten Nervenfasern dar (Abb. 25, 26). Während im Fundus der Harnblase nur wenige Neurone gekennzeichnet sind, finden sich an der Harnblasenbasis zahlreiche markierte Neurone. Letztere liegen meist in Akkumulationen von 3-6 Neuronen oder einzeln vor. Die höchste Dichte an gekennzeichneten Nervenfortsätzen der Harnblase befindet sich im M. sphincter internus (Abb. 27).

3.5.4 Akzessorische Harnblasen

Die neuronale Anordnung der akzessorischen Harnblasen ist der der Harnblase analog, jedoch ist deren Dichte geringer und es liegen die positiv markierten Nervenzellen meist einzeln (Abb. 28A, 28B).

3.6 Geschlechtsorgane

3.6.1 Ovarium, Oviduct

Im Interstitium des Eierstocks finden sich NADPHd-markierte Zellen. Die am marginalen Abschnitt der Eihüllen zum Bindegewebe des Organs gelegenen Markierungen

sind jedoch nicht NOS-i. Im Oviduct verlaufen einige markierte Nervenfasern sowohl in der Muskelschicht als auch vermehrt im darüber liegenden Bindegewebe.

3.6.2 Hoden

Die Leydig'schen Zwischenzellen färben sich schwach an, ansonsten lassen die Zellen des Hodens keine Reaktivität erkennen. Entlang der Ductuli efferentes und des Ductus epididymidis sind einzelne Neurone neben einer stark ausgeprägten Muskelzellschicht vorhanden. Auch das Epithel des Nebenhodens zeigt an der lateralen Begrenzung eine deutliche NADPH-Diaphorase-Aktivität.

3.6.3 Penis, Klitoris

Im Bindegewebe um die Schwellkörper von Penis und Klitoris befinden sich wenige positiv markierte Nervenfortsätze. Diese sind vor allem perivaskulär zwischen Kloake und Schwellkörper gelegen (Abb. 29).

3.7 Drüsengewebe

3.7.1 Innersekretorische Drüsen

3.7.1.1 Orbitaldrüsen

Die Orbitaldrüsen Glandula lacrimalis und die Harder'sche Drüse sind in der Literatur oft miteinander verwechselt worden. Die in *Trachemys scripta elegans* wesentlich größere

Harder'sche Drüse befindet sich retrobulbär in der posterioren Orbita. Sie ist von ovaler Form. Ihr Sekret wird durch horizontal angeordnete Ausführungsgänge entlang der lateralen Oberfläche auf die Nickhaut abgesondert. Die kleinere Tränendrüse schmiegt sich dagegen der vorderen medialen Orbita an. Ihre Ausführungsgänge enden im medialen Konjunktivalsack auf der Nickhaut (Baccari et al. 1990, Chieffi et al. 1996). Im Bindegewebe der intraglandulären Blutgefäße sind stets einige markierte Nervenfasern zu finden (Abb.30, 31A, 31B). In Serienschnitten wird erkennbar, dass die positiv markierten Fasern aus dem Ganglion palatinum stammen. Jedoch zeigten die innersekretorischen Drüsen im Parenchym weder in enger Nachbarschaft der sekretorischen Endstücke noch der Ausführungsgänge NADPH-Diaphorase-positiven / NOS-i Neurone oder Nervenfortsätze.

3.7.2 Endokrine Drüsen

3.7.2.1 Pankreas

Im exokrinen wie im endokrinen Pankreasanteil zeigen sich lediglich vereinzelt perivaskuläre Markierungen von wenigen Neuronen und Nervenfasern, während im Parenchym keine Strukturen markiert sind (Abb. 32)

3.7.2.2 Nebenniere

Markierte Neurone sind in der Nebenniere im Parenchym und um die feine bindegewebige Kapsel lokalisiert. Im Parenchym stehen Anhäufungen von bis zu 20 Neurone sowie einzelne Nervenzellen mit den Zellen des "adrenal tissue" in engem Kontakt (Abb. 34A, 34B und 35A, 35B). Häufig sind die dargestellten Neurone auch um intraglanduläre Blutgefäße gelegen.

Die im Bindegewebe der Nebennierenkapsel lokalisierten Neurone kommen meist als kleine fusiforme Ganglien sowie als einzelne Zellen am lateralen Rand von Aorta und Vena cava posterior vor (Abb. 33A1, 33B, 33A2).

3.8 Kardiovaskuläres System

3.8.1 Blutgefäße

Viele NADPH-Diaphorase-positive/immunzytochemisch gekennzeichnete Neurone sind sowohl in peripher gelegenen Blutgefäßen als auch in den parenchymalen Gefäßen lokalisiert. In einem Experiment wurde entlang der Verzweigung der Arteria centralis im Nervus opticus vereinzelt spezifisch markierte Nervenfasern und Neurone gefunden (Abb. 36A, 36B). In der Adventitia der Arteria carotis verlaufen die markierten Nervenfasern dicht zur Media und parallel zum Gefäßverlauf, während die markierten Perikaria meist vereinzelt am lateralen Rand der Adventitia lokalisiert sind. An den Mesenterialgefäßen scheint eine wesentlich dichtere neuronale Markierung der Arterien als der venösen Gefäßen vorzuliegen.

3.8.2 Herz

Im Myocard selbst und in den Ganglienzellen des Plexus cardiacus, die im Bindegewebe des Anulus fibrosus im Verlauf des N. vagus gelegen sind, stellt sich keine Enzymaktivität/NOS-i dar. Es finden sich aber markierte Neurone an den Koronargefäßen, so im Sinus coronarius (Abb. 37) und in den Herzohren. Diese sind meist vereinzelt entlang der Koronargefäße in der Adventitia lokalisiert. Einzelne markierte Nervenzellen finden sich im Perikard.

3.9 Lymphatische Organe

3.9.1 Thymus

Im Thymus zeigt sich keine NADPH-Diaphorase-Aktivität und keine immunzytochemische Markierung.

3.9.2 Milz

Bemerkenswerterweise wurden Nervenzellen in der Milz gefunden. Die markierten Neurone sind in der Mehrzahl um die Gefäße im trabekulären Bindegewebe gerüst lokalisiert. In den lymphoreticulären Arterienscheiden des Milzparenchyms finden sich vor der Arteria splenica im Milzhilus an bis zu deren Verzweigungen in kleine Arteriolen zahlreiche markierte Nervenfasern und neuronale Perikaria. Am Hilus selbst stellen sich ebenfalls stets einzelne Neurone positiv dar. Weiter peripher zeigt sich ein grobes netzartiges Nervenfasergeflecht um die arteriellen Blutgefäße, die venösen Sinusoide sind nicht von markierten Neuronen umgeben (Abb. 38A, 38B1, 38B2, 39).

Es sei angemerkt, dass das Ausmass an Markierungen in der Milz von Experiment zu Experiment starke Unterschiede aufwies. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass dies reale Unterschiede im Grad der Innervation dieses Organs widerspiegelt, liegt diese Variabilität vermutlich in methodischen Problemen begründet, wie z.B. eine durch die Fixierung unzulänglich blockierte Degradation des Enzyms durch endogene Proteasen.

3.10 Nichtneuronale Markierungen

Neben den Zellen und Fasern des peripheren Nervensystems finden sich einige

Markierungen im nicht-neuronalen Gewebe.

3.10.1 Epithelien

Die Epithelien des Gastrointestinaltrakts, der Trachea (Abb. 40A, 40B) und Bronchien sowie des Oviducts erscheinen positiv markiert, sind jedoch meist in der NADPHd-Histochemie und in der Immunfluoreszenz schwächer gekennzeichnet als neuronale Markierungen.

3.10.2 Erythrozyten

In einigen Experimenten sind trotz gleicher Präparation zumeist in Milz und Lunge (Abb. 11A, 11B) Erythrozyten verblieben; diese sind sowohl in der histochemischen wie in der immunologischen Methode schwach markiert.

3.10.3 Drüsengewebe

Die Zellen sekretorischer Endstücke und Ausführungsgänge der serösen Harder'schen Drüse (Abb. 31A, 31B) sowie der bei *Trachemys scripta elegans* seromucösen Tränendrüse zeigen in NADPHd-histochemischer Reaktion und in anti-NOS-i Bindung identisch starke positive Markierungen.

3.10.4 Niere

Im Parenchym der Niere stellt sich deutlich eine unterschiedliche Kennzeichnung benachbarter Nephronsegmente dar. Die Sammelrohre lassen ein marmoriertes Muster in beiden Untersuchungsmethoden erkennen, diese stellen sich auch im Ureter dar. Die Glomeruli zeigen jedoch ebenso wie die Mehrzahl der Zellen der proximalen Tubuli keine positiven Markierungen (Abb. 41).

3.10.5 Nebenniere

Die Nebennieren von *Trachemys scripta elegans* sind nicht wie beim Säuger in Mark und Rinde gegliedert. Chromaffines und hormonproduzierendes Gewebe befinden sich gemischt im Organ. Das hellere und kompaktere chromaffine Gewebe grenzt sich deutlich von dem in überwiegender Zahl vorkommenden hormonproduzierenden Gewebe ab. Einige Zellgruppen des hormonproduzierenden Gewebes zeigen ausschliesslich NADPHd-Diaphorase-Aktivität (Abb. 35 A, 35B).