

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und
Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Immunhistochemische Analyse der Atemwegsinnervation in einem
Modell der Allergen-induzierten Atemwegsentszündung“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Medveczky

aus Budapest

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. h. c. mult. D.Groneberg

2. Privat-Dozent Dr med. M John

3. Privat- Dozent Dr med. B Kütting

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Einleitung	
1.1 Asthma bronchiale	1
1.2 Genetische Mechanismen	2
1.3 Immunologische Mechanismen	2
1.4 Neuronale Mechanismen	4
1.5 Innervation der Atemwege	5
1.6 Einführung non-cholinerges non-adrenerges Nervensystem	8
1.6.1 Tachykinine	9
1.6.2 Vanilloid-like Rezeptor	10
1.6.3 Die neuronale Stickstoffmonoxid-Oxidase (nNOS) und ihre biologischen Funktionen	10
1.6.4. Das Vasoaktiv-Intestinale- Polypeptid (VIP)	12
1.6.5 Neuropeptide Y	13
1.6.6 Fragestellung und Zielsetzung der Studie	14
2. Methodik	
2.1 Einteilung der Versuchstiere in Versuchsgruppen	15
2.2 Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll	16
2.2 A Sensibilisierung	17
2.2 B Retrograde Markierung der Nervenbahnen	18
2.2 C inhalative Provokation	18
2.3 D Die Tötung der Tiere	19

2.3 Gewebsvearbeitung	19
2.4 Laborchemisch- immunologische Blutanalyse	19
2.5 Histo-immunologische Routinefärbungen	20
2.6 Immunhistochemie	20
2.7 Statistische Auswertung	23
3. Ergebnisse	
3.1 Histomorphologische Präparate und morphologische Darstellung der Atemwege	24
3.1.1 Darstellung der Atemwege der Gruppe Nativ	24
3.1.2 Darstellung der Atemwege der Gruppe OVA/OVA26	
3.2 Biochemische Laboranalyse des Ovalbumin spezifischen IgE	28
3.3 Retrogrades Tracing der sensiblen Ursprungsinervation	30
3.4 Immunhistochemische Auswertung der Neuropeptide; des NANC Nervensystems in sensiblen Ganglien	35
3.5 Retrogrades Tracing der sympathischen Innervation	42
3.6 Immunhistochemische Analyse der Neuropeptide in den Sympathischen Ganglien der Atemwege	42
3.7 Statistische Analysen und Studiaauswertung	50
4 Diskussion	
4.1 Ratte als Versuchstier	56
4.2 Histo-pathologische Analyse	56
4.3 Immunologische Analyse (IgE Bestimmung)	57
4.4 Die sensible Innervation der Atemwege der Ratte	59

4.5 Sympathische Innervation der Atemwege der Ratte	60
4.6 Neuropeptide und die induzierte Entzündung in den Atemwegen der Brown Norway Ratte	61
4.6.1 Substanz P und Tachykinine - Analyse	61
4.6.2 Vanilloid-like Rezeptor (VR 1) – Analyse	63
4.6.3 Endogenes Stickstoffmonoxid (NO) Analyse	64
4.6.4. Neuropeptid Thyrosin (NPY) - Analyse	65
4.6.5 Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)	66
5 Zusammenfassung	67
Literaturverzeichnis	69
Danksagung	85
Erklärung	86
Lebenslauf	87

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
cAMP	cyclische Adenosinmonophosphatase
CGMP	cyclische Guanosinmonophosphatase
Cy3	Cyanin 3
ChAT	Cholin Acetyltransferase
eNANC	exzitatorisches non-cholinerges non-adrenerges System
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FB	Fast Blue TM
FG	Fluoro-GoldTM
Ggl	Ganglion
GCS	Ganglion Cervicale Superior
iNANC	inhibitorisches non-adrenerges non-cholinerges System
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
iNOS	induzierbare NO-Synthase
mRNA	mitochondrale Ribonukleinsaeure
NK	Neurokinin
NKA	Neurokinin A
NKB	Nerokinin B
NK-1-Rezeptor	Neurokinin 1 Rezeptor
NK-2-Rezeptor	Neurokinin 2 Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NPK	Neuropeptid K
NPY	Neuropeptid Tyrosin Y

nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
O²	Sauerstoff
PB	phosphat buffer
PBS	phosphate buffer saline
PPT-A-Gen	Pre-Protachykinin-A- Gen
RAR	rapidly adapting stretch receptors
SCG	superior cervical ganglion (engl) Ganglion Cervicale Superior (dtsh)
SAR	slowly adapting stretch receptors
SP	Substanz P
TH	Thyrosin hydroxylase
TK	Thyrosin kinase
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VR1	Vanilloid-like Rezeptor 1
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der autonomen Nervenfasern und Ganglien und der Innervation der Atemwege	7
Abbildung 2: Der Studienverlauf	16
Abbildung 3: Darstellung der histopathologischen Präparate, Gruppe Nativ	25
Abbildung 4 : Darstellung der histopathologischen Präparate, Gruppe OVA / OVA	27
Abbildung 5: Ovalbumin-spezifisches IgE im Serum	29
Abbildung 6:Ganglion jugulare mit Darstellung der Nervenzellen (32fach vergrößert)	31
Abbildung 7:Ganglion nodosum mit Darstellung der Nervenzellen und Nervenfasern (60-fach vergrößert)	32
Abbildung 8: Bronchien mit Darstellung der Fluro-Gold reaktiven Nervenfasern (120-fach vergrößert)	33
Abbildung 9: Darstellung einer einzelnen Fluro-Gold positiven Nervenfasern	34
Abbildung 10: Substanz P	36
Abbildung 11:Vanilloid-like Rezeptor VR 1	37

Abbildung 12: neuronale Stickstoffoxidase nNOS	38
Abbildung 13 : SP Immunhistochemie Bilder	39
Abbildung 14: VR 1 Immunhistochemie Bilder	40
Abbildung 15: nNOS Immunhistochemie Bilder	41
Abbildung 16: VIP im Gagliion SCG	43
Abbildung 17: VIP Ganglion Stellatum	44
Abbildung 18: NPY im Ganglion SCG	45
Abbildung 19 : NPY Stellatum Ganglion	46
Abbildung 20 NPY Immunhistochemie SCG, Ganglion Stellatum	47
Abbildung 21 VIP Immunhistochemie SCG, Stellatum (a)	48
Abbildung 22 VIP Immunhistochemie SCG, Stellatum (b)	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppen und Untersuchungsart	15
Tabelle 2: Reagenzien	17
Tabelle 3: Primäre Antikörper	21
Tabelle 4: Sekundärer Antikörper	22
Tabelle 5: Bandfilter für Antikörperaufnahmen	23
Tabelle 6: IgE Ovalbumin – Ergebnisse	28
Tabelle 7: Signifikanz der Wertverläufe insgesamt	50
Tabelle 8: Statistik der gesamten Ergebnisse	51
Tabelle 9 Statistischer Vergleich Versuchsgruppe Nativ vs OVA/OVA	52
Tabelle 10: Vergleich zwischen den Kohorten Nativ und -/OVA	53
Tabelle 11: Vergleich zwischen den Kohorten -/OVA und OVA/-	54
Tabelle 12: Vergleich zwischen den Kohorten OVA/- und OVA/OVA	55
Tabelle 13: Anhang : Gegenüberstellung und Signifikanz zwischen SCG und Stellatum	55

Für meine Familie

*Nulla in mundo pax sincera
sine felle; pura et vera,
dulcis Jesu, est in te.*

*Inter poenas et tormenta
vivit anima contenta
casti amoris sola spe*

Antonio Vivaldi, RV 630