

## **1. Einleitung**

### 1.1 Asthma bronchiale und Einleitung zur Thematik

Das Asthma bronchiale stellt eine multifaktorielle Erkrankung dar, die sich in schubweisen Anfällen von Atemnot und Bronchospasmen manifestiert und letztlich durch eine Entzündung der Atemwege entsteht. Klinisch wegweisend ist eine anfallsweise Dyspnoe, die vornehmlich nachts oder frühmorgens auftritt. Diese Form der Atemnot wird begleitet von Husten und einem deutlich verlängerten Expirium (1). Asthma bronchiale wird in einen exogenen, hauptsächlich allergisch induzierten Typ und einen endogenen Typ mit nicht-allergischer Genese unterteilt (138). Pathophysiologisch liegen dieser Erkrankung entzündliche Veränderungen der Atemwege mit einer bronchialen Hyperreagibilität und Ödembildung in den Bronchien sowie einer erhöhten mukösen Sekretion zugrunde.

Die Erkrankung ist von großer epidemiologischer sowie sozioökonomischer Bedeutung. Asthma ist mit weltweit mehr als 300 Millionen Betroffenen eine der häufigsten chronischen Krankheiten. Epidemiologische Untersuchungen aus den Vereinigten Staaten ergaben, dass die Prävalenz des Asthma bronchiale allein in den USA etwa 7,2 Prozent der gesamten Bevölkerung beträgt. Aus der National Health Interview Survey des Gesundheitsministeriums der Vereinigten Staaten geht hervor, dass im Jahre 1997 etwa 26,7 Millionen Amerikaner mit Asthma diagnostiziert wurden (Prävalenz 96,6/1000). Jährlich werden circa eine Million Patienten hospitalisiert oder notfallmäßig versorgt, wobei sich die Behandlungs- und Arbeitsausfallkosten im Jahr 1998 auf 11,8 Milliarden Dollar beliefen (156). Der Anstieg der Erkrankungsrate bei Kindern gemessen im Zeitraum vom Anfang der 80er Jahre bis 1993-94 betrug 75 % (2). In der BRD wird die Prävalenz bei Kindern auf 10 % geschätzt. Folglich handelt es sich beim Asthma um eine ernst zunehmende Erkrankung, die die Kostenträger im Gesundheitssystem in der Zukunft deutlich belasten wird. Für die Patienten geht diese Atemwegserkrankung mit großem Leidensdruck einher, zumal die meisten Atemnotanfälle als lebensbedrohlich empfunden werden. Neben den genetischen und immunologischen Ursprüngen des Asthma bronchiale wird in der wissenschaftlichen Diskussion zunehmend der Einfluss der Innervation der Atemwege bemerkt. Dabei stehen Neuropeptide, die von den Nervenfasern im Laufe einer Entzündungsreaktion freigesetzt werden, im Mittelpunkt der Forschung. Diese seit dem Ende der 80er Jahre bekannten Peptide wurden unter dem Namen „non-cholinerges non-adrenerges Nervensystem“ (NANC) zusammengefasst. Die Rolle dieser Mediatoren auf die Entzündung der Atemwege soll in dieser Abhandlung auf einem Rattenmodell untersucht werden.

## 1.2 Genetische Mechanismen

Nach der genetischen Ursache des Asthma bronchiale ist in einer Vielzahl von Studien gesucht worden. Einige dieser Untersuchungen wie die Studien von Halls (3), oder Morton (4) wiesen eine Vielzahl von unterschiedlichen genetischen Mutationen und Varianten auf. Diese können sowohl durch pathogenetische als auch pharmakologische Auswirkung auf das Immunsystem und die Atemwege von Wichtigkeit sein (5). Dabei wurde der Begriff der sogenannten Umwelthypothese postuliert. Diese beschreibt eine erhöhte Prädisposition für komplexe genetische Mutationsmuster bei Individuen in den Industrienationen mit der Folge einer Anfälligkeit für Erkrankungen(139). Die Ursache dieser läge in einer Mindereexposition gegenüber pathogenen Keimen. Diese Patienten sollen über noch unbekannte genetisch getriggerte Mechanismen mit einer pathologisch gesteigerten Immunantwort auf endogene oder exogene Reize reagieren. Eine entscheidende Rolle spielen dabei Immunglobulin E -vermittelten Entzündungsprozesse. Die eindeutige Klärung dieses Pathomechanismus und genaue Lokalisation der beteiligten Genloci steht jedoch noch aus.

## 1.3 Immunologische Mechanismen

Asthma bronchiale zeichnet sich immunologisch durch eine verstärkte Einwanderung von Immunzellen in die Atemwege aus. In histologischen Präparaten finden sich neben einer charakteristischen Verdickung der Basalmembran und mukösen Obstruktion der Bronchien, eine starke Infiltration von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie degranulierenden Mastzellen (6). Die pathogenetische Bedeutung dieser Befunde wird in folgenden Beobachtungen deutlich. Die Anwesenheit insbesondere der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten führt durch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren zu einer Hypertrophie der Basalmembran der Atemwege, der oben geschilderten verstärkten Mukussekretion und folglich zu einer erhöhten bronchialen Reaktivität (7), (8).

Den einzelnen Immunzellen und ihren Mediatoren werden verschiedene Wirkungen zugesprochen. Dabei stehen sich Prozesse der humoralen und zellulären Immunantwort gegenüber. Von großer Bedeutung zuerst sind die humorale Antwort und das Immunglobulin E. Dieses vermittelt eine Degranulation der Mastzellen, mit der nachfolgenden Freisetzung von Histamin und Leukotrienen. Das Immunglobulin E nebst weiteren Immunmediatoren besitzt zahlreiche Einflüsse auf die residenten Zellen und steht im Mittelpunkt der entzündungsvermittelnden Reaktionen (9), (10), (140).

Neben der humoralen Immunantwort werden auch Mechanismen der zellulären Immunabwehr aktiviert. Insbesondere sind es die CD4-T-Lymphozyten, die einen großen Einfluss auf das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellen haben. Die CD4-T-Lymphozyten werden dabei in die Th1-Untergruppe zur Abwehr der intrazellulären Pathogene und Th2-Untergruppe zur Bekämpfung u. a. von Endoparasiten eingeteilt. Die Balance dieser beiden Untergruppen sorgt für eine effiziente zelluläre Immunabwehr. Jegliche Überreaktion einer dieser beiden Untergruppen hat allerdings für die Immunabwehr eines Individuums bedeutsame Auswirkungen. So geht ein Übergewicht von Th1-Lymphozyten mit verschiedenen Auto-Immunprozessen wie Diabetes mellitus oder Morbus Crohn einher. Hingegen kann eine Th2-Lymphozyten-überreaktion allergische Reaktionen in Gang setzen. Beim Asthma dominiert ein immunologisches Ungleichgewicht, die so genannte "Th1 / Th2 Imbalance" zugunsten der pro-inflammatorischen Th2 T-Lymphozyten. Die von den Th2-Lymphozyten freigesetzten Interleukine verfügen über zahlreiche entzündungsfördernde Wirkungen auf das Immun-, und Blutgefäßsystem (11), sowie das bronchiale Gerüst (12). Die Interleukine führen zunächst über eine Freisetzung von Histaminen, Leukotrienen und Prostaglandinen zu einem Atemwegsödem und einer Konstriktion der glatten Muskulatur der Bronchien. Die Atemwege reagieren auf Dauer mit einem aktiven Umbau, dem "Remodelling"-Prozess (13) und zusätzlich mit einer Verstärkung der bronchialen Reaktivität.

#### 1.4 Neuronale Mechanismen

Die Atemwege werden von einem dichten Netz aus Nervenfasern durchzogen. Über diese Nerven werden lebenswichtige Vorgänge wie die Atmung, Sekretion des Schleims und Schutz der Atemwege vor Fremdkörpern geregelt. Die Innervation der Atemwege wird vom sensiblen und autonomen Nervensystem gesteuert. Das autonome Nervensystem wird dabei klassischerweise in den Parasympathikus und den Sympathikus unterteilt. Innerhalb des Nervensystems werden die Impulse in den Synapsen mit Hilfe von sogenannten Neurotransmittern übertragen. Diese Substanzen werden in den synaptischen Spalt freigesetzt und vermitteln Nervenimpulse auf ihre Zielorgane. Die Haupttransmitter sind Noradrenalin (NA) für den Sympathikus und Acetylcholin (Ach) beim Parasympathikus. Neben den Überträgerstoffen dieser klassischen Nervensysteme wurden in den letzten Jahren immer wieder Peptide in den Nervenfasern beschrieben, die sich weder dem parasympathischen noch dem sympathischen Nervensystem zuordnen ließen (14), (15). Sie wurden unter dem Begriff "non-adrenerges non-cholinerges" Nervensystem (NANC) zusammengefasst. Diese Neuropeptide, verfügen über zahlreiche Wirkungen auf die glatte Muskulatur, die Gefäße und die Immunzellen der Atemwege. So wirken einige von ihnen zum Beispiel als starke Bronchokonstriktoren, während andere die Gefäßpermeabilität heraufsetzen oder Entzündungsreaktionen beeinflussen können. Es gibt Hinweise, dass sowohl beim Asthma bronchiale als auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) diese Neuropeptide essenzielle Mediatoren einer Entzündung sind und diese Erkrankungen so in großem Umfang beeinflussen können (15), (16), (17). Die genaue Bedeutung und Funktion der einzelnen Neuropeptid-Mediatoren werden in den nächsten Abschnitten erläutert.

## 1.5. Innervation der Atemwege

Die Innervation der Atemwege wird klassischerweise in ein autonomes sympathisches und parasympathisches Nervensystem und ein sensibles, afferentes Nervensystem unterteilt. Das autonome Nervensystem ist der willkürlichen Kontrolle des Individuums entzogen und versorgt mit seinen Fasern die glatte Muskulatur der Bronchien, die Gefäße und die mukösen Drüsen. Ebenso beeinflusst es in übergeordneten supra-spinalen Zentren die Atemfrequenz, die Engstellung der Bronchiolen sowie die Herztätigkeit und damit die Perfusion der Lunge. Die Zentren und die Verschaltungen der jeweiligen autonomen Systeme weisen erhebliche Unterschiede auf. So hat der Sympathikus seine Zentren im thorakalen Rückenmark (Th2-Th10). Die präganglionären Fasern verlassen das Rückenmark über die Rami communicantes albi und ziehen von dort zu den paravertebralen Grenzstrangganglien. In diesen Ganglien (Ganglion cervicale superius, Ganglion Stellatum und den thorakalen Rückenmarkganglien) erfolgt die Umschaltung von den präganglionären auf die postganglionären Fasern. Nach der Signalübertragung in den Ganglien laufen die Signale von dort in den postganglionären Fasern zu ihrem Endorgan. Dort setzen sie an ihren sympathischen Nervenendigungen den Transmitter Noradrenalin (NA) frei. Zusammen mit dem Noradrenalin wird durch sympathische Stimuli/Reize auch das Adrenalin aus dem Nebennierenmark freigesetzt. Diese beiden Substanzen werden zusammenfassend als Katecholamine bezeichnet. Interessanterweise weist die periphere Lokalisation der sympathischen Fasern erhebliche Speziesunterschiede auf. In den Atemwegen des Menschen findet man noradrenerge sympathische Nervenfasern um die Gefäße und submuköse Drüsen versammelt (18), aber nur spärlich in der glatten Atemwegsmuskulatur lokalisiert (18), (19), (20). Beim Meerschweinchen hingegen kann ein dichtes Geflecht von sympathischen Fasern in der glatten Muskulatur der Bronchien identifiziert werden.

Die Zentren des Parasympathikus befinden sich im Nucleus ambiguus und Nucleus dorsalis nervii vagii im Hirnstamm. Die präganglionären Fasern des Parasympathikus verlassen das zentrale Nervensystem (ZNS) mit dem 10. Hirnnerv (N. Vagus), um mit seinem Verlauf in den thorakalen Raum zu gelangen. Dort werden die präganglionären Fasern in den lokalen parasympathischen Ganglien, endorgannah, umgeschaltet und ziehen in einer kurzen Strecke zu ihrem jeweiligen Erfolgsorgan (141), (142).

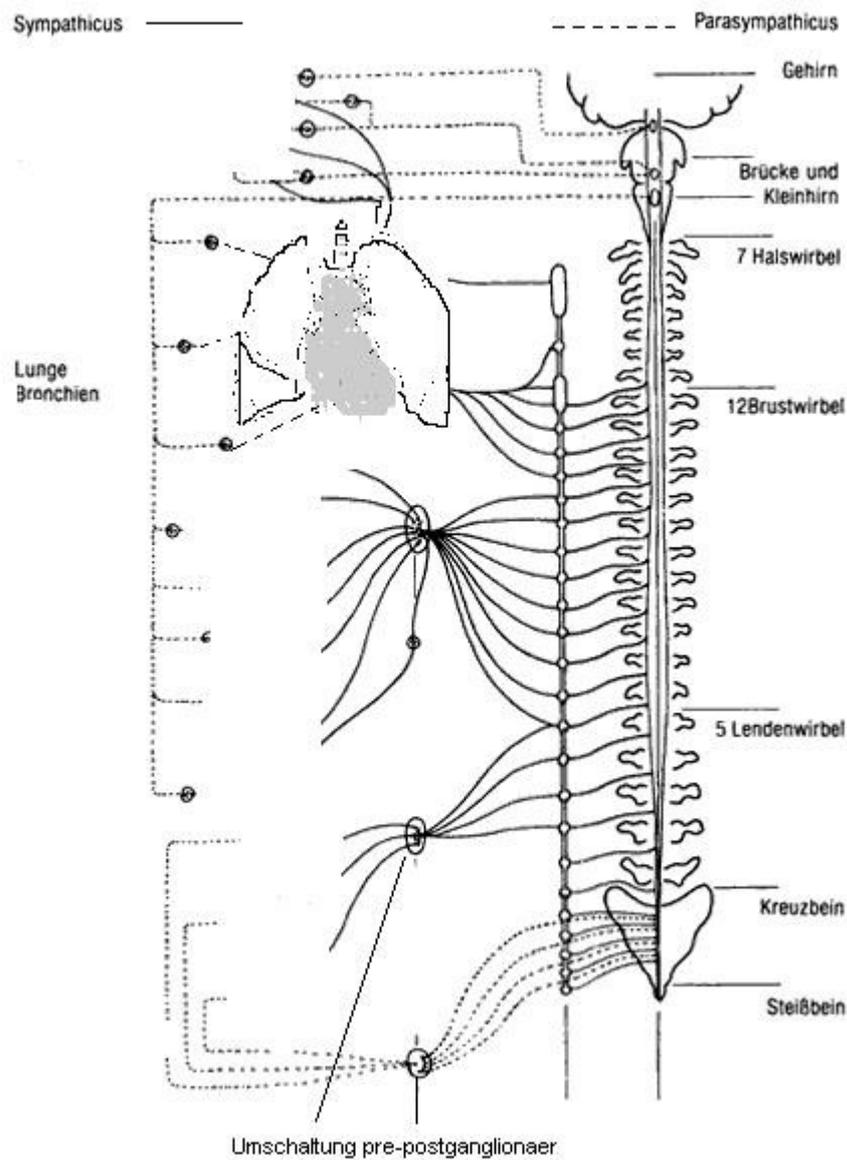
Die sensible Versorgung der Atemwege erfolgt über afferente Fasern, die entlang der Trachea und der intrathorakalen Organe mit dem Nervus Vagus verlaufen, und dann zum Ganglion Jugulare und Ganglion Nodosum ziehen. Dort liegen die Perikaryen dieser pseudo-unipolaren Neurone (21). Des Weiteren wurde eine zusätzliche afferente Versorgung der Atemwege aus den thorakalen Spinalganglien nachgewiesen. Diese zusätzlichen Nervenfasern verlaufen zusammen mit den sympathischen Axonen, durchqueren die sympathischen Grenzstrangganglien und ziehen zu den Laminae I & II (Substantia gelatinosa) im Hinterhorn des Rückenmarks. Die Zellkörper dieser speziellen Neurone liegen dann in den Spinalganglien (21). Die Gesamtheit der afferenten, sensiblen Fasern wird dann im Tractus solitarius verschaltet und projiziert zentral auf den sensiblen Cortex. Die afferenten Nervenfasern der Atemwege erhalten die Informationen von Berührungs- und Dehnungsrezeptoren an der Trachea, den Bronchien und den Bronchioli sowie der Pleura. Weiterhin ist bekannt, dass die sensiblen Nervenfasern durch exogene (Capsaicin) und endogene (Histamin, Bradykinin und Prostaglandine) Stimuli aktiviert werden können (22). Aufgrund dieser und weiterer elektrophysiologischer Eigenschaften lassen sich die sensiblen Nervenfasern in drei Klassen einteilen:

Die langsam adaptierenden Dehnungsrezeptoren (slowly adapting stretch receptor □SAR) sind hauptsächlich in der glatten Muskulatur der Trachea und der Bronchien lokalisiert. Durch ihre myelinisierten Axone erreichen sie eine relativ hohe Leitungsgeschwindigkeit von 5,8 m/s.

Die schnell adaptierenden Dehnungsrezeptoren (rapidly adapting stretch receptors RAR) befinden sich sowohl im respiratorischen Epithel als auch in der glatten Atemwegsmuskulatur. Ihre Axone sind ebenfalls myelinisiert.

Zuletzt findet man C-Fasern in der Trachea, dem Bronchus und dem Lungenparenchym. Diese leiten aufgrund ihrer unmyelinisierten Axone sehr langsam (1 m/s).

Ergebnisse aus elektrophysiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, sowie aus retrograden Tracingexperimenten zeigten, dass RAR und C-Fasern nicht nur elektrophysiologisch, sondern auch neuroanatomisch verschiedenen Populationen angehören (23). An den Synapsen der zentralen Projektion setzen die sensiblen Nervenfasern klassisch, exzitatorische Transmitter wie Glutamat bzw. Aspartat frei. Zusätzlich kann eine Freisetzung von weiteren Mediatoren durch adäquate Reizung oder antidrome Stimulation in den peripheren Nervenfasern bewirkt werden (24).



**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der autonomen Nervenfasern und Ganglien und der Innervation der Atemwege (modifiziert nach: Birnbauer, Schmidt, Biologische Physiologie, Springer Verlag 2004)**

## 1.6 Neuropeptide und das non-adrenerge non-cholinerge Nervensystem (NANC)

Neben den klassischen Mediatoren Noradrenalin (NA) in postganglionären sympathischen Fasern und Acetylcholin (ACh) in postganglionären parasympathischen Nervenfasern, existieren eine Reihe von Neuropeptiden, die Effekte auf den Muskeltonus der Blutgefäße, Bronchien, auf Entzündungsreaktionen, Immunzellen und die Drüsensekretion haben (16), (17). Diese Neuropeptide gehören zu keinem morphologisch eingrenzbaeren Nervensystem (25), (26), (27), das deshalb unter dem Begriff *non-adrenerges non-cholinerges Nervensystem (NANC)* zusammengefasst wurde. Zu diesem Nervensystem zählen Peptide wie Stickstoffmonoxid (NO), (28), das Neuropeptid Thyrosin Y (NPY), (29), (30) und die Substanz P (31) sowie Rezeptoren wie der Vanilloid-like Rezeptor (VR1), (32). Aufgrund physiologischer und pharmakologischer Erkenntnisse können die NANC-Mediatoren in zwei funktionelle Gruppen eingeordnet werden (33). Peptide, die entzündungsfördernd wirken, wie das Calcitonin-Gen related Peptide (CGRP) und die Substanz P werden als exzitatorisches NANC (eNANC) zusammengefasst. Neuropeptide, die anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen wie das NPY bezeichnet man als inhibitorisches NANC (iNANC). Einige Arbeiten postulieren einen möglichen pathogenetischen Einfluss der NANC-Mediatoren auf die Atemwegsentzündung beim Asthma bronchiale (34), (35), (36). Seitdem wird mit den Neuropeptiden und ihren Wirkungen auf Entzündungen der Begriff der *"neurogenen Entzündung"* verbunden. Das bedeutet, dass eine Reizung der sensiblen Innervation der Atemwege durch exogene oder endogene Irritatoren reaktiv zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, einer Vasodilatation sowie der Schleimsekretion führt. Jancsó wies diesen Mechanismus durch die Reaktion von Capsaicin, einem Chilibestandteil, mit der Haut und Konjunktiven bei Ratten und Meerschweinchen nach (37). Dies führte zur Beobachtung, dass nach starker Irritation der sensiblen Innervation, diese Impulse nicht nur afferent weitergeleitet wurden, sondern auch letztlich eine lokale Freisetzung von Neuropeptiden, verbunden mit einer lokalen starken entzündlichen Reaktion, eintrat (37). Diese Hypothese wird als der so genannte "Axon-Reflex" bezeichnet (38), (36).

In tierexperimentellen Studien wurde seitdem mehrmals der Einfluss der Tachykinine und anderer Neuropeptide auf die sensible Innervation der Atemwege über den Axonreflex und die folgende neurogene Entzündung beschrieben (39), (40). In den Atemwegen der Ratte wurde dieses Phänomen von Lundberg gefunden (41). Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim Menschen festgestellt werden (42).

### 1.6.1 Tachykinine

Zu den am besten untersuchten Neuropeptiden zählen die Tachykinine, wobei die meisten Erkenntnisse zur Substanz P, einem prominenten Vertreter dieser Neuropeptid-Familie, existieren. Bei den Tachykininen handelt es sich um eine Familie von Neuropeptiden, die alle an ihrem C-terminalen Ende die gleiche Aminosäuresequenz Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (X steht für eine variable Aminosäure) aufweisen. Neben der Substanz P wurden weitere Tachykinine wie das Neurokinin A (NKA) sowie dessen N-terminal verlängerte Peptide Neuropeptid K (NPK) und Neuropeptid Y (NPY) in den Atemwegen beschrieben. (44). Diese Peptide werden vom gleichen Gen, dem Präprotachykinin A-Gen (PPT-A) codiert. Aus dem Präprotachykinin A-Gen wird mitochondriale RNA transkribiert und alternativ gespleißt, sodass 4 mRNA-Formen ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) entstehen können. Tachykinine vermitteln ihre Wirkungen über spezielle Tachykinin-Rezeptoren, diese sind der NK1-, NK2-, NK3-Rezeptor (43). Auf einen Reiz hin werden die in den Vesikeln gespeicherten Peptide zur Synapse transportiert und an Nervenendigungen freigesetzt, um dann an die NK-Rezeptoren zu binden (46). Dieser Reiz kann ein niedriger pH-Wert, Capsaicin oder Histamine, Prostaglandine wie auch andere Immunmodulatoren sein (47), (48). Tachykinine wurden in den Nervenfasern, unter anderem den C-Fasern (45) der unteren Atemwege des Meerschweinchens und des Menschen mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen. Heute ist bekannt, dass jedes Kompartiment der unteren Atemwege mit Ausnahme der Knorpelspannen von Tachykinin-haltigen Axonen durchzogen und innerviert wird. Die pathophysiologischen Wirkungen beruhen auf immunologischen Beobachtungen, zum Beispiel, dass die Substanz P neben einer eosinophilen Chemotaxis (49), eine Immunglobulin E-vermittelte Mastzelldegranulation mit Freisetzung von hochpotenten Entzündungsreaktionen bewirkt (50). Aufgrund dieser physiologischen und immunologischen Einflüsse wurde mehrmals ein wichtiger Einfluss der Tachykinine auf die Entstehung und Vermittlung der *neurogenen Entzündung* postuliert (51), (52), (53), (54), (55).

### 1.6.2. Vanilloid-like Rezeptor (VR1)

Die sensiblen Fasern, welche die Atemwege innervieren, sind entweder myelinisierte A $\alpha$ -Fasern oder unmyelinisierte C-Fasern. Besonders die C-Fasern sind auf die Leitung von Schmerzimpulsen ausgerichtet und gelten daher als die Nozizeptoren der Atemwege. Die Reizung dieser Fasern erfolgt über die Stimulation des VR1-Rezeptors. Dieser Rezeptor, ein ligandengesteuerter Kanal, besteht aus sechs transmembranösen Domänen und reagiert auf unspezifische Reize wie Hitze, Änderungen des pH-Wertes (56) und Substanzen, die bei einer Entzündung im Rahmen metabolischer Vorgänge freigesetzt werden. So kann der VR1-Capsaicin-Rezeptor auch durch ungesättigte Fettsäuren oder Leukotriene aktiviert werden (57). Über verschiedene molekulare Mediatoren kommt es nach Aktivierung des VR1-Rezeptors zu einer erhöhten Anzahl von Entladungen der Nervenfasern, die dann ihre Aktionspotenziale in Richtung ZNS senden oder Botenstoffe wie Substanz P und Bradykinine freisetzen (58), (59), (61). Neben Freisetzung von Entzündungsmediatoren ist der Vanilloid-Rezeptor ebenfalls ein wichtiger Mediator der peripheren Hyperalgesie und damit ein wichtiger Schrittmacher einer Entzündung (32).

### 1.6.3 Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS)

Das endogene Stickstoffmonoxid (NO) ist ein im Organismus vorkommendes Gasmolekül, das über zahlreiche pulmonale und vaskuläre Wirkungen verfügt. Dieses Stickstoff Molekül wird mit Hilfe von L-Arginin von drei verschiedenen Enzymen gebildet. Diese Enzyme werden NO-Synthasen (NOS) genannt. Es gibt drei Arten: zwei konstitutionell vorhandene NO-Synthasen (nNOS), die neuronale NOS 1 und die in den Epithelzellen der Atemwege lokalisierte NOS 3 sowie die induzierbare NO-Synthase 2 (NOS 2). (62), (63). Die neuronale NOS 1 wird in den parasymphatischen (vagal-sensorischen) Fasern und Ganglien (jugulare-nodosum) exprimiert, sodass das NO als ein Art Neurotransmitter beschrieben wird (64). Die Wirkungen von NO werden nicht über Rezeptoren vermittelt. Vielmehr kann dieses Gasmolekül per diffusionem in die Zelle gelangen, wo es dann cGMP-vermittelt die biologischen Wirkungen entfaltet (28). Die Einflüsse des NO in den Atemwegen werden in pulmonale, vaskuläre und immunologische unterteilt.

Das NO übt eine relaxierende Wirkung auf glatte Gefäßmuskulatur aus, weshalb Stickstoffmonoxid zunächst als der Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) der Atemwege galt. Studien an Meerschweinchen, wie auch am Menschen belegten die bronchodilatierende Wirkung (65). Auf das pulmonale Gefäßsystem wirkt NO ebenso stark dilatierend. Dies wird besonders im pulmonalen Niederdruckkreislauf deutlich, was auch klinisch zum Beispiel in der Behandlung des ARDS oder pulmonalen Hypertonus genutzt wird (66), (67), (68), (69). Zu den Nebenwirkungen im Gefäßsystem zählt vor allem die erhöhte Plasmaexsudation, die über die Öffnung von Venolen zu einem kapillären Leck und einer Ödembildung führt (70), (71). Die immunologischen Eigenschaften dieses Gasmoleküls wurden noch nicht eindeutig festgelegt. Es wird über proinflammatorische Eigenschaften wie die Unterdrückung einer Th1-Lymphozyten-Antwort mit Entwicklung eines Th2-Übergewichtes berichtet (72). Dies führt zur Mastzelldegranulation, Immunglobulin E-Freisetzung sowie einer Eosinophilie (73). Trotz einiger uneinheitlicher Beobachtungen gibt es aber auch feste Hinweise darauf, dass das NO einer der Mediatoren des iNANC in den unteren Atemwegen des Menschen ist (33). Das NO in der Expirationsluft ist zudem ein wesentliches Diagnostikum für die Schwere des Asthmas und ermöglicht mitunter einige prädiktive Aussagen über den therapeutischen Erfolg (28), (74), (75).

#### 1.6.4 Vasoaktives Intestinale Polypeptid (VIP)

Das vasoaktiv intestinale Polypeptid ist ein aus 28 Aminosäuren aufgebautes Peptid, welches neben der Wirkung im Dünndarm über besonders starke und eindrucksvolle Wirkungen in den Atemwegen verfügt (76). VIP-haltige Nervenfasern durchziehen die Atemwege mit einem dichten Netz. Sie greifen besonders an der glatten Muskulatur der Gefäße, den Bronchien und den Drüsen an (77). Bei einem geeigneten Stimulus (Entzündung, Anwesenheit von Immunmediatoren wie Histamin) wird das VIP aus freien Nervenendigungen freigesetzt. Die Wirkungen werden über zwei Typen von Rezeptoren (VPAC) vermittelt. Der Beschreibung des ersten VPAC 1-Rezeptors in der Ratte folgte die Entdeckung des zweiten VPAC 2-Rezeptors in weiteren Säugern wie Mensch und Maus. Das VIP löst nach einer Verbindung mit dem VPAC-Rezeptor eine cyclisches AMP (cAMP) gesteuerte Kaskade aus, die dann die biologischen Wirkungen dieser Substanz vermittelt (80). Der Abbau des VIP wird durch zahlreiche Enzyme begünstigt. So werden im Falle einer Entzündung verschiedene Enzyme aktiv (u. a. Mastzellenzym, NEP = Neutrale Endopeptidase), die das VIP sehr schnell abbauen können (81-83). Dies könnte Beobachtungen erklären, wonach beim akuten Asthmaanfall der VIP-Spiegel im Plasma niedriger ist als bei beschwerdefreien Erkrankten (84).

Zu den bekanntesten Wirkungen zählen die pulmonale und die vaskuläre Dilatation. Insbesondere ist das VIP als der stärkste bislang bekannte Bronchodilatator bekannt, der bevorzugt an großen Bronchien wirkt (85). Dieses Polypeptid ist ferner wegen der vasodilatierenden Potenz insbesondere im Pulmonalarterien-, Bronchialstammbereich (86) bekannt. Zudem wird vermutet, dass die Histaminsensibilität (144) des Atemwegsepithels und der Zellen (143) unter VIP reduziert wird, was einen großen Durchbruch in der Therapie der entzündlichen Lungenerkrankung haben könnte. Die potenziell anti-inflammatorischen und immun modulierenden Wirkungen des VIP in den Nervenfasern scheinen die Vermutung zu belegen, dass es sich hierbei um einen der Mediatoren des iNANC handeln könnte. Dies würde auch die Koexpression mit dem NO bestätigen (87), (78), (79).

#### 1.4.5 Neuropeptid Y

Das Neuropeptid Tyrosin (NPY) ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid, das zum ersten Mal vor 14 Jahren im Gehirn und im autonomen Nervensystem von Schweinen nachgewiesen wurde (88). Es wird im Gehirn und dort verstärkt im Cerebellum in hohen Konzentrationen gefunden (89). Die Entwicklung spezieller immunhistochemischer Antikörper ermöglichte den Nachweis dieser Substanz auch in den peripheren Nerven der Maus (90), (91), (92). Beim Menschen und Ratten konnte das NPY in den Nervenfasern der gesamten Atemwege aufgefunden werden (93). Die NPY-haltigen Nervenfasern fanden sich verstärkt um die seromukösen Drüsen sowie die Gefäße und glatte Muskulatur der Atemwege. Die Entfaltung der NPY-Wirkung erfolgt nach Andocken an einen NPY-Rezeptor über einen G-Proteingekoppelten Prozess. Dabei wird entweder die Adenylatcyclase herunterreguliert oder andererseits über einen intrazellulären Kalziumanstieg (94), (95) die Wirkung vermittelt. Diese Wirkungen im ZNS reichen vom Einfluss auf die Nahrungsaufnahme über hypothalamische Einflüsse (96), (97) und anxiolytische wie auch sedative Wirkungen (98) bis hin zur Senkung der Krampfschwelle bei der Epilepsie. Das NPY führt ferner zu einer Vasokonstriktion der Blutgefäße in den Atemwegen (99, 100), (101). Aufgrund der schleimhautabschwellenden Wirkung (102) und einer deutlichen Reduktion der Mukussekretion (103) wird das NPY zu den Mediatoren des inhibitorischen NANC zugerechnet.

### 1.6.6. Fragestellungen

Der Wissensstand über die Lokalisation und Wirkung der Neuropeptide in den unteren Atemwegen ist vor allem an der Maus und dem Meerschweinchen untersucht worden. Hingegen wurden die neurobiologischen Vorgänge im Rahmen einer Atemwegsentzündung beim Menschen nur partiell beschrieben. Die Ratte ist aufgrund der morphologischen und physiologischen Ähnlichkeit mit dem Menschen in Bezug auf die Atemwege als Untersuchungsobjekt besonders gut geeignet.

Folgende Aspekte sollen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

\*Die räumliche Anordnung und die Ursprünge der Innervation der unteren Atemwege der Brown Norway Ratte.

\*Der Nachweis der Neuropeptide des NANC in den Nervenfasern und Ganglien, welche die Atemwege versorgen.

\*Eine qualitative und quantitative Analyse der Expression der NANC-Mediatoren im Rahmen einer allergischen bronchialen Entzündung.

Die zusammengetragenen Daten sollen einen Beitrag zur Vervollständigung der Informationen über die neurobiologischen Zusammenhänge in den Atemwegen liefern. Dabei sollte es möglich sein, die neuronalen Mediatoren des NANC im Verlauf einer respiratorischen Entzündung zu erfassen und die möglichen Trends zu beschreiben.

## 2. Material und die Methodik

### 2.1 Versuchstiere

Für die Studie wurden 25 weibliche, 8 -12 Wochen alte Brown Norway Ratten verwendet. Diese sind beim Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin für Laborzwecke gezüchtet worden. Die Tiere wurden über die gesamte Studienzeit veterinärärztlich überwacht und sämtliche Tierschutzbestimmungen sind eingehalten worden.

Es wurde eine Unterteilung der Tiere in 4 Versuchsgruppen vorgenommen. Drei Gruppen zählten jeweils fünf Tiere und eine Gruppe zehn Tiere. Die Sensibilisierung der Untersuchungstiere mit dem Hühnereiweiß Ovalbumin erfolgte entweder inhalativ über eine Verneblerbox oder durch intraperitoneale Injektion. Eine Gruppe wurde sowohl inhalativ als auch intraperitoneal mit dem Ovalbumin provoziert. Die Versuchsgruppen wurden folgendermaßen eingeteilt:

Die unbehandelte Gruppe trug die Kennzeichnung "Nativ", während die mit dem Hühnereiweiß Ovalbumin "OVA" intraperitoneal (i.p.) sensibilisierten, nicht inhalativ gechallengekten Tiere "OVA/ -" bezeichnet wurden. Die nicht i. p. sensibilisierte, aber inhalativ provozierte Gruppe trug den Namen " - / OVA ". Die intraperitoneal sensibilisierte und inhalativ, provozierte Versuchsgruppe hingegen wurde "OVA / OVA" benannt (Synopsis der Einteilung, s. Tab. 1.)

**Tabelle 1: Versuchsgruppen und Untersuchungsart**

Name	Untersuchungsart
Nativ	Unbehandelt
OVA / - Kontrolle I	OVA Sensibilisierung, intraperitoneal
- / OVA Kontrolle II	Keine Sensibilisierung, OVA-Challenge inhalativ
OVA / OVA	OVA Sensibilisierung intraperitoneal und OVA Challenge per inhalationem

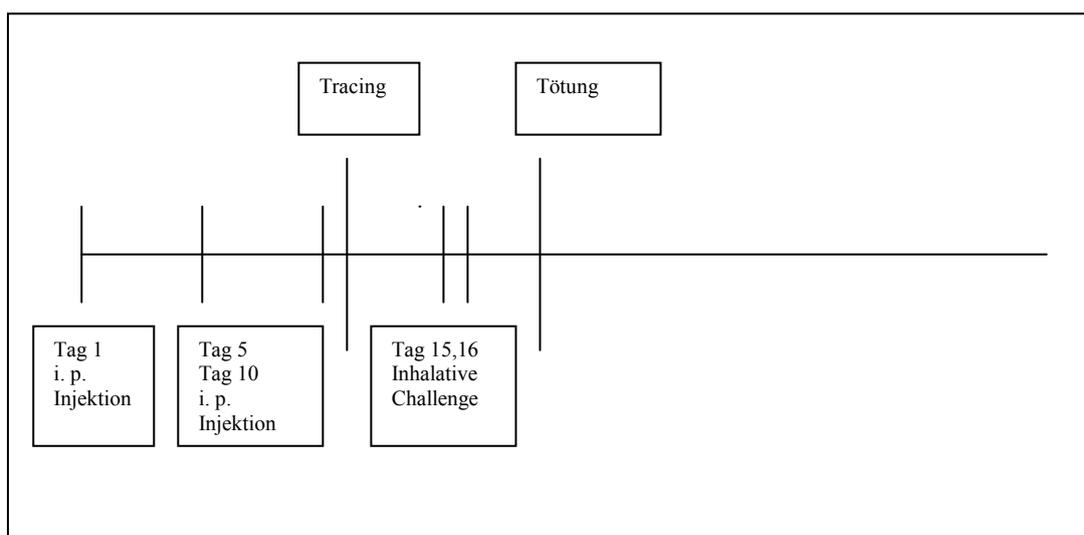
Alle Versuchstiere wurden in der Tierexperimentellen Abteilung des Universitätsklinikums Charité unter Einhaltung sämtlicher Tierschutzverordnungen, in einem hygienisch einwandfreiem Raum untergebracht, gepflegt und von diensthabenden Tierärzten überwacht. Ein Kontakt mit anderen Spezies wurde verhindert und der Kontakt mit anderen Artgenossen vermieden.

Die Tiere der letzten Gruppe OVA/OVA, die eigentlichen Experimentiere, wurden unter besonderen aseptischen Bedingungen in einem keimfreien Isolatorschrank mit ständig gefilterter Luftzufuhr und Temperaturüberwachung untergebracht. Um das Risiko einer zusätzlichen Infektion der Tiere auf ein absolutes Minimum zu reduzieren, wurde neben den strengen Isolationsmaßnahmen bei der Unterbringung der Beobachtungsgruppe auch steriles Material (Kanülen) und Schutzkleidung für Studienteilnehmer verwendet.

## 2.2 Versuchsaufbau und Studienprotokoll.

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ovalbumin und einer Trägerlösung (PBS +Alu, s Tab. 2) behandelt. Dies fand am Tag 1, 5, und 10 statt. Zusätzlich wurde am ersten Tag eine Pertussisvaccine-haltige Lösung mit einer Keimzahl von  $2 \times 10^9$  appliziert. Am Tag 11 erfolgte die retrograde neuronale Markierung und am Tag 15 und 16 wurden die Tiere mit einem Ovalbuminvernebler inhalativ gechallengt. Am Tag 18 fand die Tötung der Tiere und die Ganglien- und Gewebentnahme statt (104), (105), (106).

(s. Abbildung 2)



**Abbildung 2: Der Studienverlauf**

## A. Sensibilisierung

Am Tag 1, 5 und 10 wurden alle Tiere der Gruppe OVA / - und der Versuchsgruppe OVA / OVA sensibilisiert. Dabei wurde eine intraperitoneale Injektion einer 500 µl Ovalbumin-haltigen Lösung verabreicht. Diese Lösung setzt sich am Tag 1 aus 10 µl Ovalbumin versetzt mit 250 µl Aluminiumhydroxid und 230 µl Phosphatpuffer-Saline (phosphate-buffer-saline PBS). Hinzu kamen 10 µl einer Pertussisvaccine-haltigen Lösung (Keimzahl  $-2 \times 10^9$ ). Die genaue Zusammensetzung wurde in der Tabelle 2 dargestellt.

Am Tag 5 wurde den gleichen Tieren erneut eine intraperitoneale Lösung injiziert, die diesmal keine Pertussisvaccine mehr enthielt und sich aus 10 µl Ovalbumin, 250 µl Aluminiumhydroxid und 240 µl PBS Lösung zusammensetzte. Am Tag 10 wurde diese Prozedur mit identischer Dosierung wiederholt.

### **Blocklösung:**

10 % normales Schweineserum, 0,5 % Tween und 0,1 % Rinderserumalbumin in Phosphatpuffer-Saline (phosphate-buffered saline- PBS)

### **Phosphatpuffer**

0,1 M 230 ml 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 770 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  bei pH 7,4

### **Phosphatpuffer-Saline, (PBS, phosphate-buffered saline)**

28,75 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 96,20 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  gemischt mit 22,4 g NaCl und mit Aqua dest. auf % Liter auffüllen.

### **gepuffertes Glycerol**

Karbonatpuffer (0,5 M  $\text{NaHCO}_3$  mit 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , bei pH 8,6) mit Glycerol im Verhältnis 1:2 mischen.

## **Tabelle 2: Reagenzien**

## B) retrograde neuronale Markierung

Die retrograde Markierung fand am Tag 11 statt. Dabei wurden die Ratten jeweils durch eine intramuskuläre Injektion mit Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke Davis, Freiburg, BRD; 50 mg/kg Körpergewicht) in den Oberschenkel betäubt und analgesiert. Nach einem fünfminütigen Intervall folgte jeweils eine weitere intramuskuläre Injektion an der kontralateralen Seite mit Dihydro-Thiazin-Hydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen, BRD; 50 mg/kg Körpergewicht), die zu einer zusätzlichen Analgesie führte und eine Relaxation der Tiere bewirkte. Die Trachea wurde mit einem medianen, zervikalen Längsschnitt ventral freigelegt und durch einen kleinen Schnitt zwischen zwei benachbarten Knorpelspannen eröffnet. Die Kanüle der 10- $\mu$ l Mikropipette Springe (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurde durch die tracheale Inzision bis in den rechten Hauptbronchus eingeführt und 5  $\mu$ l Hydroxystilbamidine (5 % w/v in 0,9 % NaCl) von Biotium, Hayward, CA, USA injiziert. Hydroxystilbamidine ist das Äquivalent zu FluoroGold™. Ref: Brain Res.377,147 (1986) und 553,135 (1991).

Die tracheale Wunde konnte anschließend mit einer 7-0 Vicrylnaht (Ethicon, Norderstedt, BRD) und der Hautschnitt mit einer 4-0 Vicrylnaht (Ethicon) zugenäht werden. Die operierten Tiere wurden unter einer UV-Lampe bis zum Aufwachen vor Unterkühlung geschützt. Sie erholten sich innerhalb von 2 Stunden nach der Operation und begannen sofort zu fressen. Alle Tiere konnten sich ungestört erholen, bis sie nach 7 Tagen ausgewertet wurden.

## C) Inhalative Provokation.

Die Tiere der Versuchsgruppen - / OVA und OVA / OVA wurden in einer Verneblerbox am Tag 15 und 16 mit OVA inhalativ provoziert. Die Dosis für ein Tier betrug 50 mg OVA [Stärke 5] / 5 ml phosphate-buffered saline (PBS). Der Ultraschall-Nebulizer (DeVilbiss, Somerset, PA) verteilte das Ovalbuminkonzentrat in einem feinen Nebel innerhalb der Box für 20 Minuten. Die unter sterilen Kautelen gehaltenen Tiere der Gruppe OVA / OVA wurden in einer besonderen, sterilisierten Nebulizerkammer behandelt.

#### D) Die Tötung der Tiere.

Die Tötung der Tiere erfolgte am Tag 18 in tiefer Isoflurannarkose. Danach fand die Entnahme der Lungen mit der Trachea (Thoraxpaket), der Ganglien Cervicale Superior (beidseitig) sowie Ganglien Stellatum (beidseitig) statt. Die sensiblen Ganglien jugulare und nodosum wurden aus anatomischen Gründen zusammen entnommen. Nach der Schädelöffnung erfolgte die Entnahme des Ganglion Trigeminale. Zudem wurden intracardial und aus der Vena Cava 5 ml Blut entnommen.

#### 2.3 Gewebeverarbeitung

Die durch die Eröffnung des Thorax kollabierten Lungen wurden zur Optimierung der Fixierung und Erleichterung der späteren Bearbeitung intraluminal mit Zamboni-Lösung (2 % Paraformaldehyd, 15 % gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (PP), pH 7,4) durch die Trachea perfundiert. Alle Gewebeproben wurden in Zamboni-Lösung für ca.24 Stunden, abhängig von der Gewebeprobengröße, immersionsfixiert. Nach mehrmaligem Spülen mit 0,1 M Phosphatpuffer (PP), pH 7,4 sei das Gewebe in einem 18 % saccharosehaltigen 0,1 M PP für ca.24 Stunden zur Kryoprotektion überführt worden. (siehe Tabelle 2). Für die weitere Bearbeitung wurde das Gewebe mit dem Kryofixateur OTC (MilesInc, Elkart, IN, USA) auf Filterpapier aufgebracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, katalogisiert und dann bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Von den gefrorenen Ganglien wurden bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Kryostaten (Leica, Cryostat CM1850, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland),  $8\text{ }\mu\text{m}$  dicke Serienschritte (Lungengewebe,  $12\text{ }\mu\text{m}$  dick) angefertigt und auf Chromalaun/Gelatine beschichtete Objektträger aufgenommen. Die Schnitte wurden danach bei Dunkelheit für 30 Minuten luftgetrocknet und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.4 Laborchemisch- immunologische Blutanalyse

Das Blut der Ratten wurde zur ovalbuminspezifischen IgE-Bestimmung in unser Labor eisgekühlt verbracht. Dort erfolgte die IgE Messung in der ELISA-Technik mittels NUNC Dänemark™ (4-49824) Module für ovalbuminspezifisches Immunglobulin.

Zur Entwicklung der Proben ist Steptavidinperoxidase (Calbiochem, Nr.189733, 1mg/ml) verwendet worden, die in einer 1: 10. 000 Verdünnung von in PBS –Tween aufgelöst wurde.

Die Messung fand mit Hilfe eines MR 7000 Photometers, Dynatech, Denkendorf, BRD, Filter 460 nm, Referenzfilter 490 nm statt.

## 2.5 Histomorphologische Routinefärbung

Das gefrorene Gewebe wurde 30 min vor der Bearbeitung aufgetaut. Es erfolgte danach eine schrittweise Ethanolfixierung in absteigender Konzentration. Einer Spülung mit Aqua dest. folgte eine Fixierung mit Hämalaunlösung (Mayer, Merck, Darmstadt, BRD) und Eosin (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). Die Präparate wurden auf einen mit Glycerol beschichteten Objektträger aufgetragen.

## 2.6 Immunhistochemie

Das mit Tracer markierte Gewebe musste bei der Bearbeitung vor Lichteinfall geschützt werden. Alle Schnitte wurden vor der Weiterverarbeitung mit immunhistochemischen Methoden eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit einer Blocklösung (siehe Tabelle 2) für eine Stunde vorinkubiert. Die zu untersuchenden Ganglien wurden danach unmittelbar vor der Auswertung in Serie geschnitten. Die Schnitte hatten jeweils 8 µm Dicke. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurde jeder zehnte Schnitt zur Auszählung verwendet. Nach der einstündigen Inkubation mit der Blocklösung wurden die Präparate für 10 min in PBS eingetaucht und dann vorsichtig abgespült. Danach wurde der erste Antikörper auf die Schnitte in jeweils erforderlicher Verdünnung (siehe Tabelle 3) aufgetragen und über die Nacht inkubiert.

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Polyklonaler <b>Substanz P</b> Antikörper, Kaninchen (Chemicon, Int. Kalifornien, USA)	1: 5000
Polyklonaler <b>VR1</b> Antikörper Kaninchen (Chemicon Int. Kalifornien, USA)	1: 2000
Polyklonaler <b>NOS 1</b> Antikörper, Kaninchen (Chemicon Int. Kalifornien, USA)	1: 4000
Polyklonaler <b>NPY</b> Antikörper. Kaninchen (Chemicon Int. Kalifornien, USA)	1: 2000
Polyklonaler <b>VIP</b> Antikörper Kaninchen (Chemicon Int, Germany)	1:500

**Tabelle 3: Primäre Antikörper**

Zur Detektion des Primärantikörpers wurden nach zweimaligem Spülen (2x 10 Minuten) mit PBS die entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde aufgetragen. (siehe Tabelle 4).

<b>Sek. Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Cy3 konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper, Esel (Dianova, Hamburg, Dtschl.)	1: 400
Fluorescein (FITC) konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper, Goat (Dianova, Hamburg, Dtschl.)	1:400

**Tabelle 4: Sekundärer Antikörper**

Für VR1, nNOS-Antiserum wurde ein Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) Kaninchen-IgG Antiserum, für SP, NPY und VIP ein Cyanin3 (Cy3) -konjugiertes Esel-IgG Antiserum aufgetragen. Die Proben wurden nach einer 1,5-stündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper erneut mit PBS abgewaschen und im gepufferten Cis-Glycerol (pH 8,6) eingedeckt. Die Präparate wurden darauf unter einem Leica DM XRA2-Fluoreszenzmikroskop gesehen. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Diagnostics™ Kamera, Model 4#1. Die immunhistochemische Auswertung fand mit entsprechenden Bandfiltern für Cy 3 und FITC statt. (Tabelle 5). Zur abschließenden Bildverarbeitung wurde Leica Qwin™ Software, Leica, Germany, verwendet.

Filter für Fluoro-Gold

Band pass 340-380

FITC- Filterkombinationen

Band pass 470-490nm / Band pass 515-550nm

Cy3 - Filterkombinationen

525-560nm/ Band pass 570-650nm

**Tabelle 5: Bandfilter für Antikörperaufnahmen**

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS-Programm. Die Signifikanzen wurden mittels nicht-parametrischer Tests, wie dem Mann-Whitney - Test ausgerechnet. Die Verläufe und Trends der Werte wurden mit dem Jonckheere–Terpstra–Test errechnet. Die Validität der statistischen Aussagen wurde im Institut für Medizinische Statistik der Charité abschließend überprüft und bescheinigt.

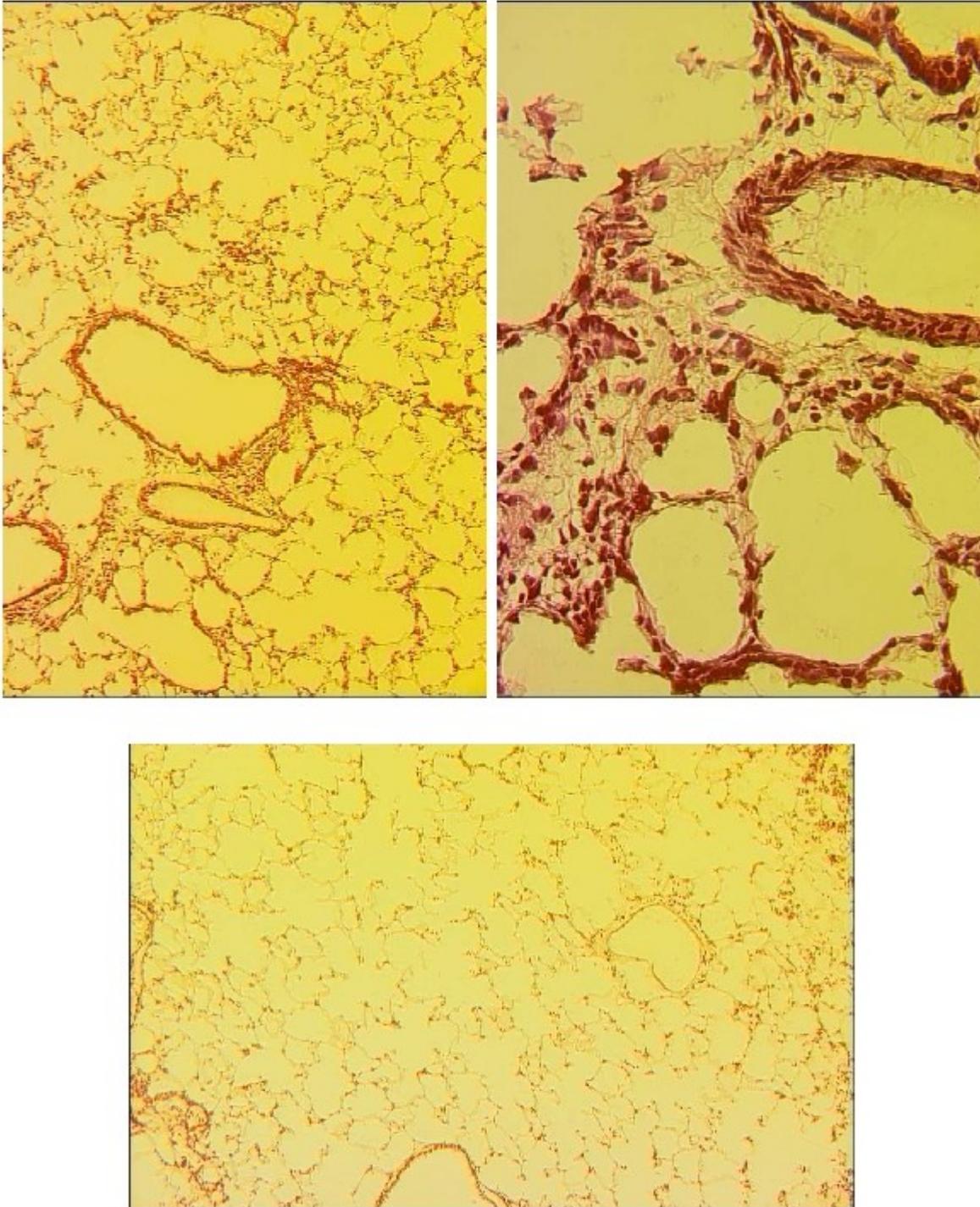
### **3 Ergebnisse**

#### 3.1. Histo-morphologische Präparate, morphologische Darstellung der Atemwege

Die histopathologische Auswertung der Lungen sollte den morphologischen Zustand der Atemwege nach der Protokoll-Behandlung aufzeigen. Dazu wurden die Lungen der Brown Norway Ratte aus den jeweiligen Versuchsgruppen entnommen und das Bronchiensystem mittels einer HE-Färbung histologisch dargestellt.

##### 3.1.1 Darstellung der Atemwege der Gruppe Nativ

Die Auswertung der histologischen Präparate der Atemwege dieser Versuchsgruppe wies ein einheitliches Bild auf. Dieses zeichnete sich durch eine intakte Struktur der Bronchien aus (s Abb.3). Darüber hinaus war die Basalmembran regelrecht gebaut, es fanden sich keine Zeichen von Hypertrophie der glatten Muskulatur. Die Alveolen sowie das parabronchiale Gewebe waren frei von eingewanderten Immunzellen, insbesondere der Granulozyten sowie Leukozyten.

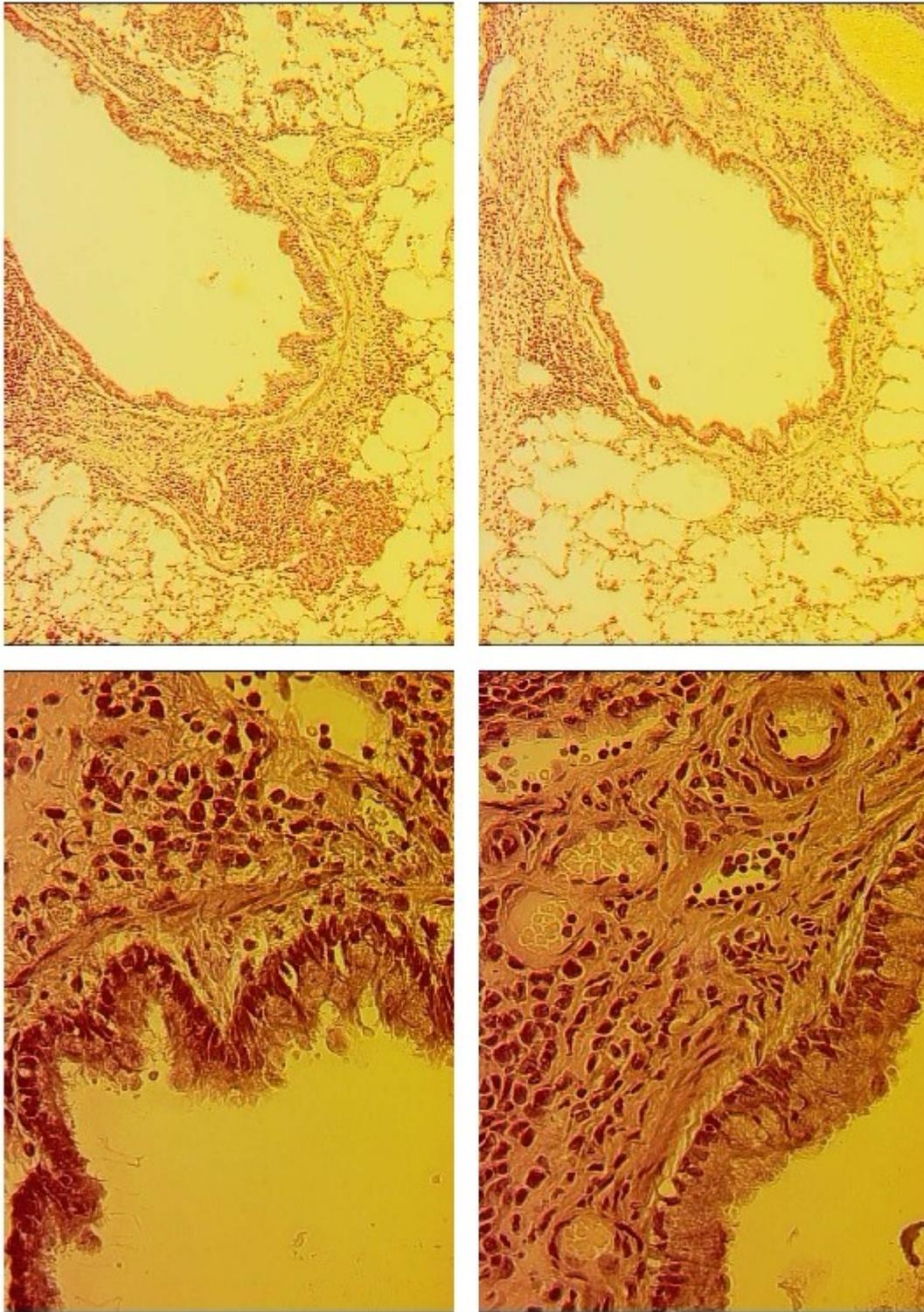


**Abbildung 3: Darstellung der histopathologischen Präparate, Gruppe Nativ**

Aufnahmen des Lungengewebes (HE Färbung) unter 12facher Vergrößerung mit Darstellung eines Bronchusanschnitts. Es zeigt sich eine intakte Struktur peribronchial, ferner kein Hinweis auf Infiltration mit Immunzellen. Die 60-fach vergrößerte Bronchusaufnahme (oben rechts) zeigt die intakte Basalmembran.

### 3.1.2. Darstellung der Atemwege der Gruppe OVA / OVA

Die Präparate wiesen eine sehr starke entzündliche Reaktion auf. Die Basalmembran der einzelnen Bronchien war deutlich verdickt. In unmittelbarer Nachbarschaft der Bronchien fanden sich sehr starke Drüsengewebskomplexe mit deutlichen Zeichen von Sekret im Bronchiallumen. Das Epithel war stellenweise beschädigt und das peribronchiale Gewebe deutlich mit Immunzellen (Eosinophile Granulozyten, Leukozyten) infiltriert. Zudem fand sich eine starke lokale Lymphknotenhyperplasie. (s.Abb.4, Seite27)



**Abbildung 4. Darstellung der histopathologischen Präparate, Gruppe OVA / OVA**

Oben: Aufnahmen der HE Färbungen (12 fach) mit starken inflammatorisch-reaktiven Veränderungen und Unten: Aufnahmen 60-fach: Beachte die Drüsenpakete und die Hypertrophie der Schleimzellen, neben der Lymphozytose.

### 3.2. Biochemische Laboranalyse des IgE - Ovalbumin

Das aus der Vena Cava und dem Herzen stammende Blut wurde zur ELISA-Auswertung in unser Labor gebracht. Die Analyse des Ovalbumin spezifischen Immunglobulins E im Serum der Versuchstiere ergab folgenden Sachverhalt. (s Tab. 6)

Name der Probe	OVA- spez. IgE (LU / ml)
Gruppe 1 - Nativ, unbehandelt	A 1 = 6,91 A 2 = 4,91 <b>Mittelwert = 5,915</b> Stabw.1,421
Gruppe 2 - OVA / -, intraperitoneal sensibilisiert	B 1 = 268 B 2 = 197,2 <b>Mittelwert = 232,6</b> Stabw 50,06
Gruppe 3 - - / OVA, inhalative challenge	C 1 = 9,43 C 2 = 7,58 <b>Mittelwert= 8,505</b> Stabw.1,308
Gruppe 4 - OVA/ OVA, sensibilisiert und challenge	Cy 1 = 336,5 Cy 2 = 257,4 Cy 3 = 289,4 <b>Mittelwert= 294,433</b> Stabw= 39,78

**Tabelle 6: IgE Ovalbumin - Ergebnisse**

### Ovalbuminspezifisches Ig E im Blut

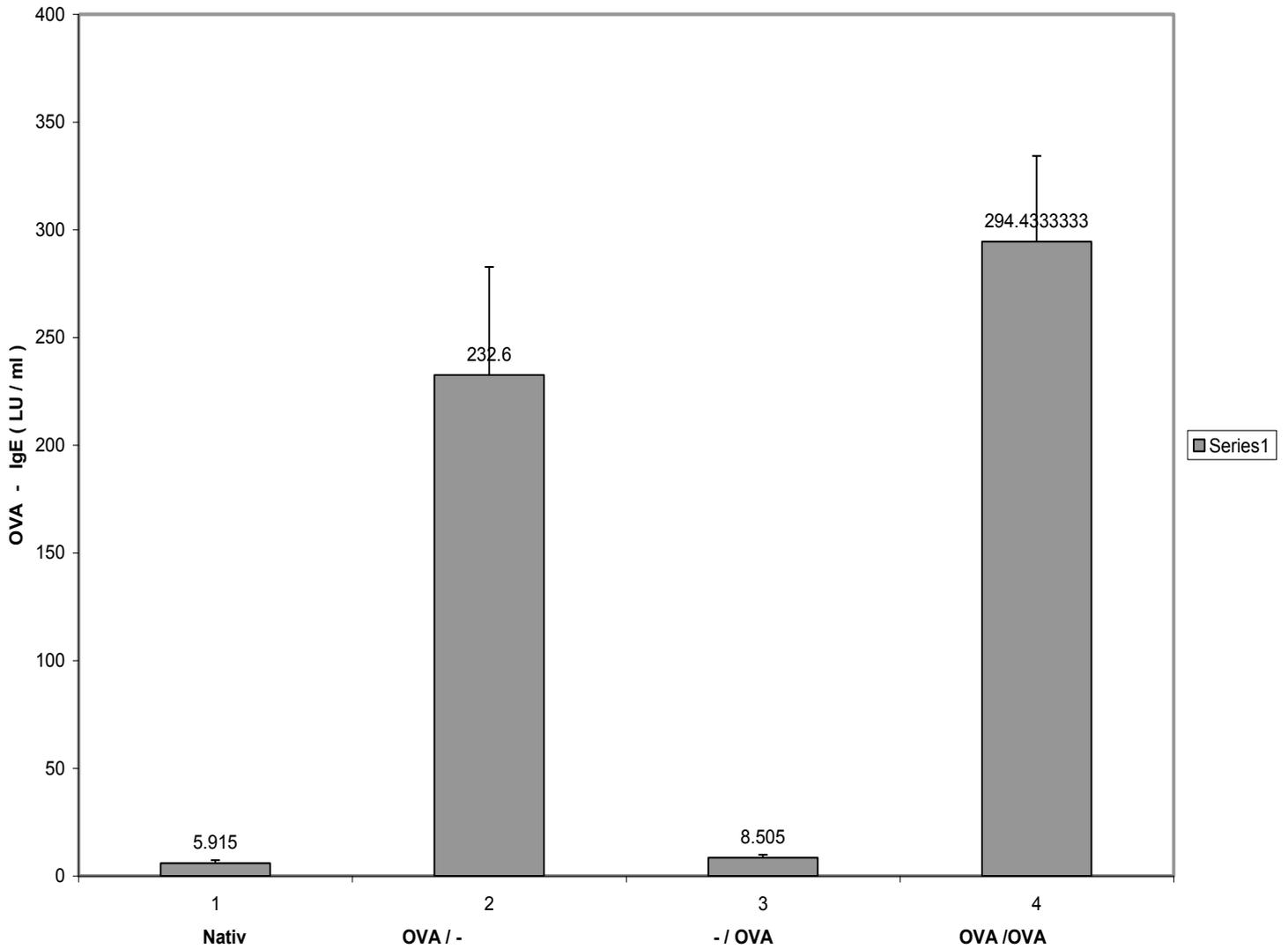
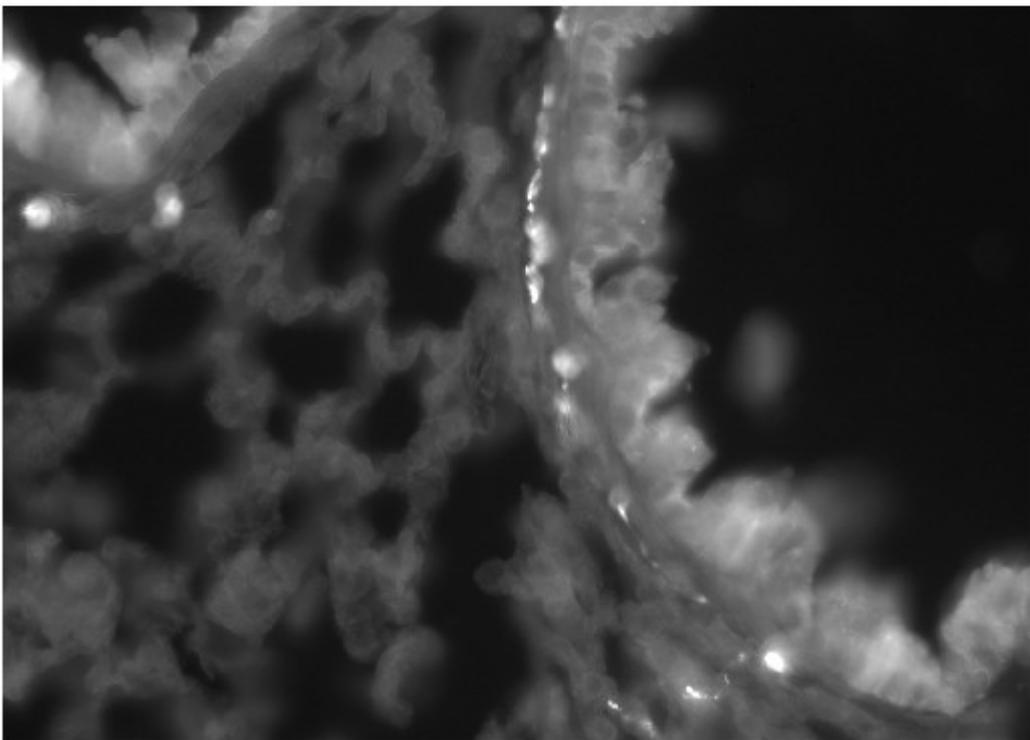
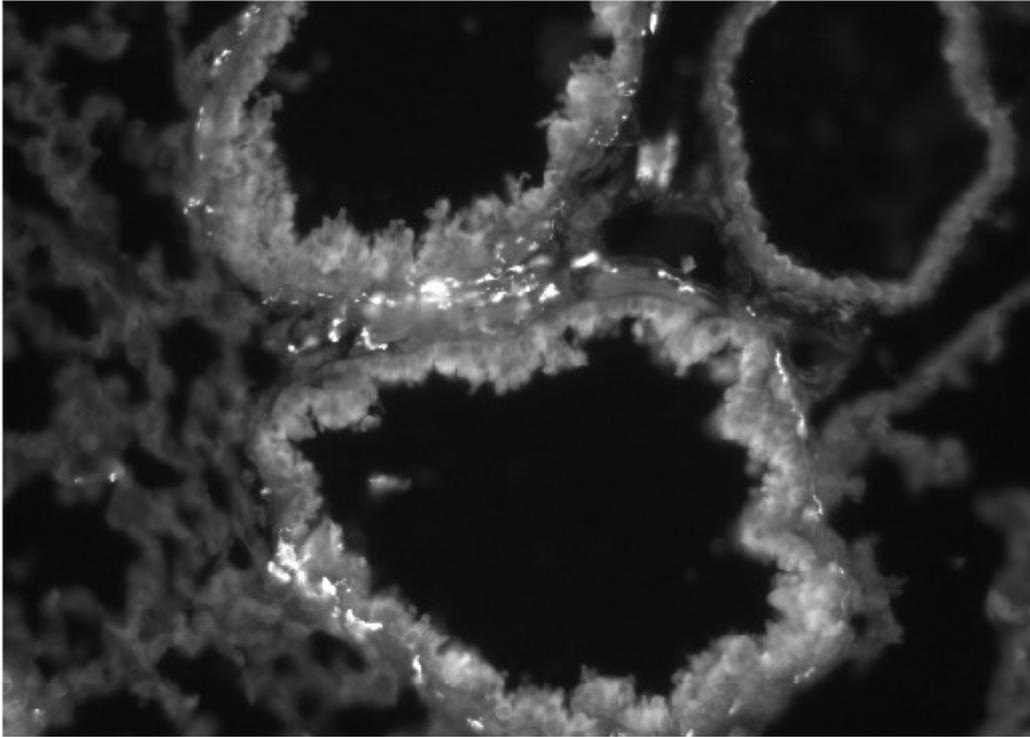


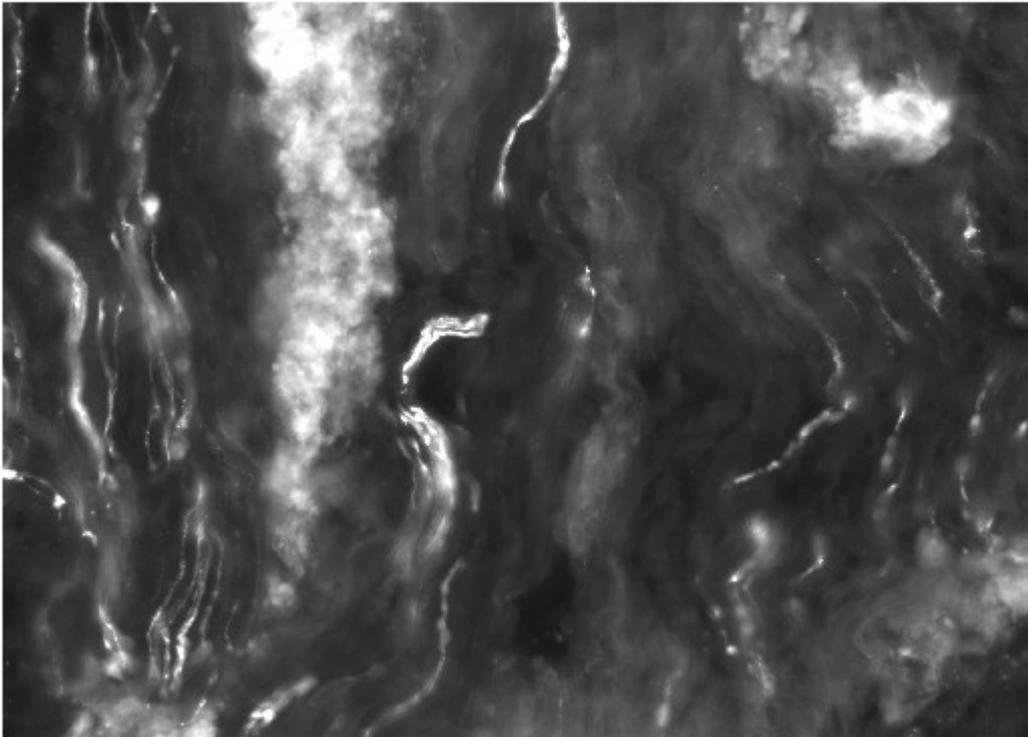
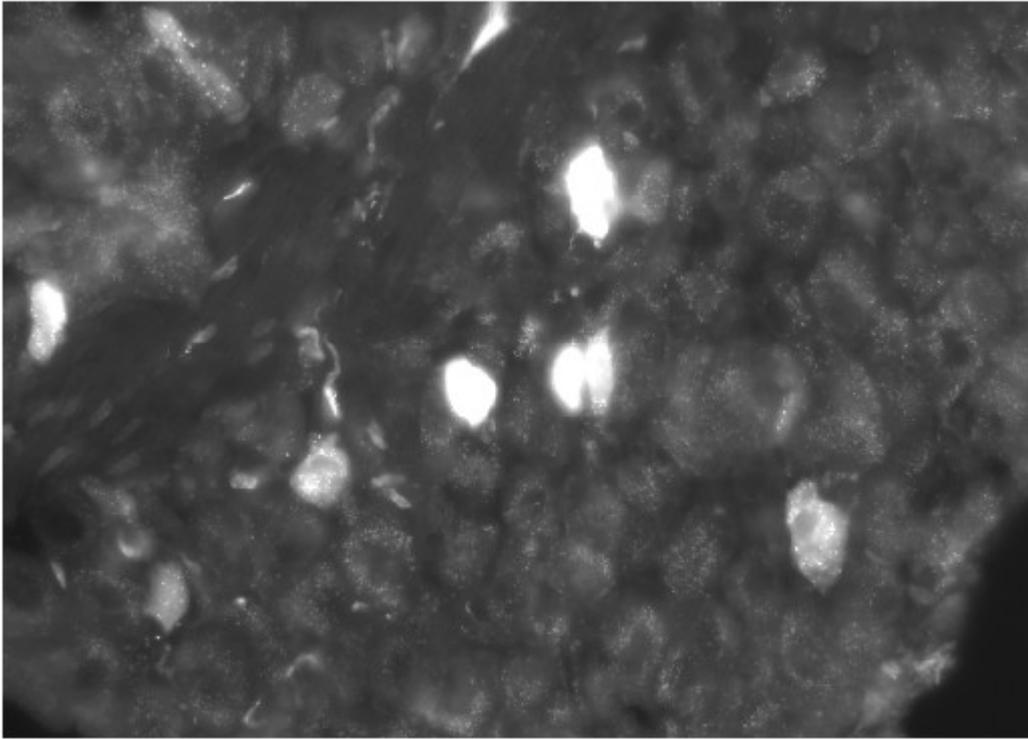
Abbildung 5: Ovalbumin-spezifisches IgE im Serum

### 3.3 Retrogrades neuronales Tracing der sensiblen Ursprungsinervation

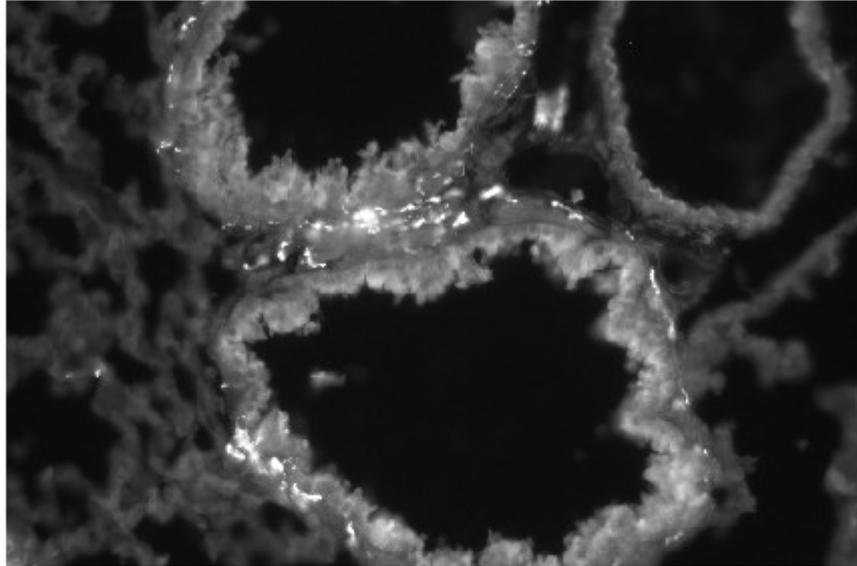
Mittels retrograder neuronaler Markierung mit dem Tracer Fluoro-Gold™ konnten Nervenfasern bis hin zu ihren Ursprungsganglien verfolgt werden. Dabei ergab die Auswertung der immunhistochemischen Aufnahmen, dass die sensiblen Fasern in die Ganglien jugulare und Ganglion nodosum zurückverfolgt und lokalisiert werden konnten. Beispielaufnahmen und die Verteilung des Tracers in den Nervenfasern wurden in den Abbildungen 6-9 verdeutlicht.



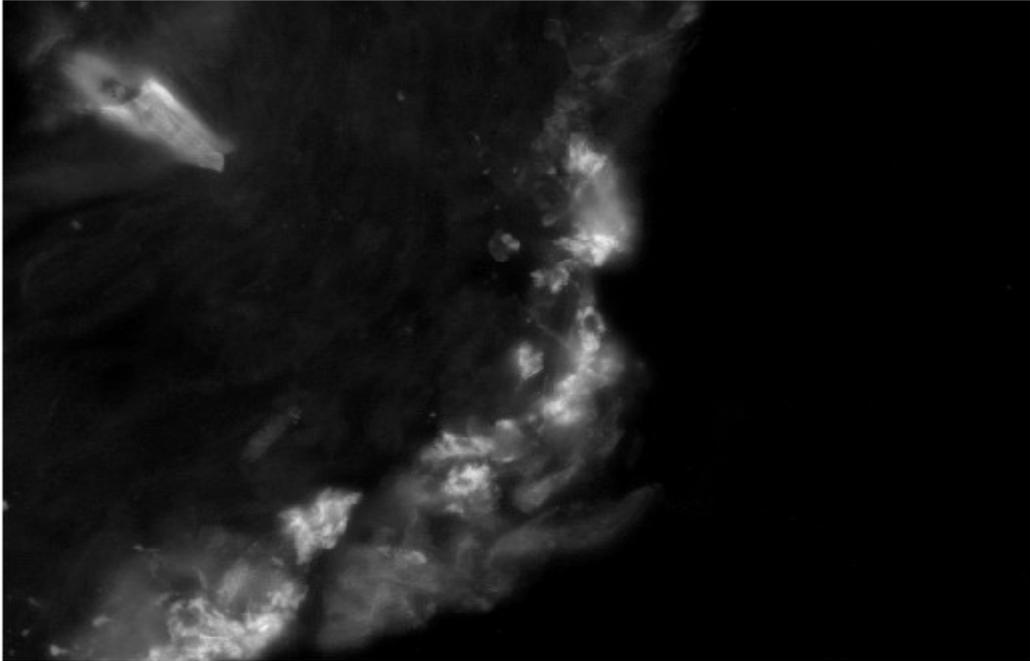
**Abbildung 6: Bronchien mit Fluoro-Gold (120 fach)**



**Abbildung 7: Ganglion nodosum mit Darstellung der Nervenzellen und -fasern  
Beachte die leuchtenden Fluoro-Gold Nervenzellen und -fasern (60-fach vergrößert)**



**Abbildung 8: Bronchien mit Darstellung der Fluro-Gold reaktiven Nervenfasern  
(120-fach vergrößert)**



**Abbildung 9: Darstellung einer einzelnen Fluro-Gold positiven Nervenfaser**

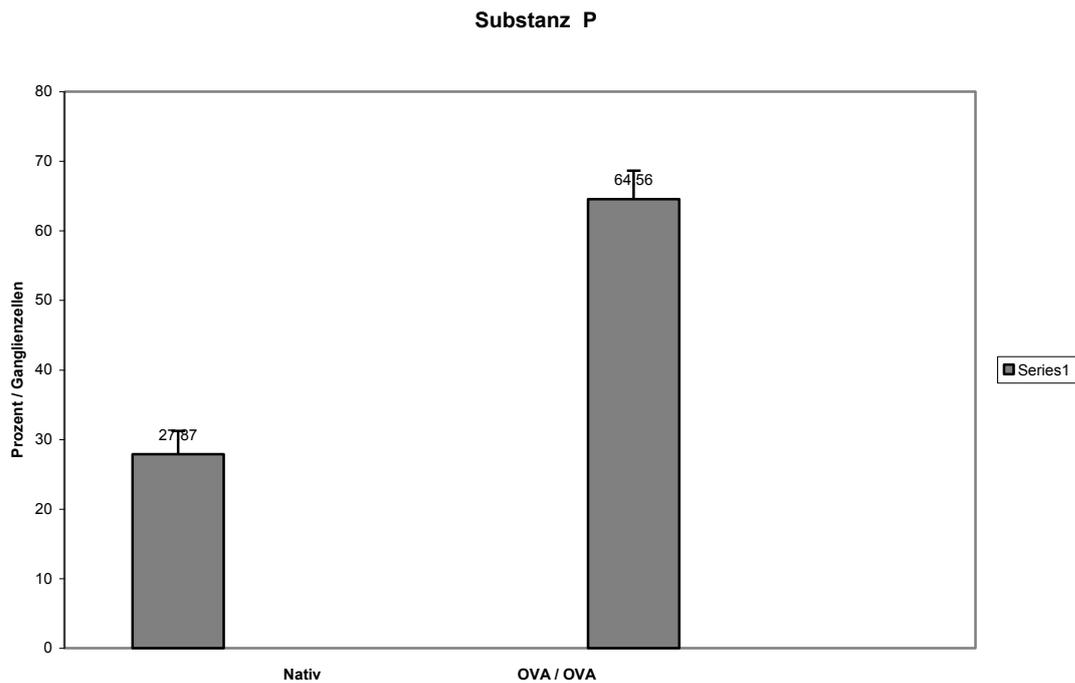
### 3.4. Immunhistochemische Auswertung der Neuropeptide des NANC in sensiblen Ganglien

In den Präparaten der Ganglien jugulare-nodosum der Tiere nativ und OVA/OVA wurde die Immunreaktivität der Neuropeptide Substanz P, Vanilloid-like Rezeptor (VR1) und der neuroepithelialen Stickstoffoxidase (nNOS) untersucht.

Beim Nachweis der Substanz P wurde eine durchgehend, signifikant ansteigende Tendenz unter allen Versuchsgruppen verzeichnet. Die Expression von Substanz P stieg von 27,87 % der Ganglienzellen bei der Gruppe der unbehandelten Tiere bis auf über 64 % bei den Versuchstieren OVA / OVA. Dies entspricht einen Anstieg von über 2,2 fachen des Ausgangswertes (s.Abb.10). Die immunhistochemische Aktivität des Vanilloid-like Rezeptors (VR1) zeigte unter allen Versuchstieren keinen signifikanten Anstieg in den Perikaryen der Ganglien jugulare-nodosum. Je nach Behandlung waren zwischen 50,7 % und 55 % der Ganglienzellen positiv für VR 1 (s. Abb.11).

Die neuroepitheliale Stickstoffoxidase (nNOS) zeigte den größten Anstieg in ihrer immunhistochemischen Expression in den Ganglien. Insgesamt mehr als 83 % der sensiblen Ganglien waren bei den Versuchstieren OVA / OVA positiv, was im Vergleich zur unbehandelten Gruppe Nativ, einen Anstieg von über 186.2 % des Ausgangswertes (29 %) bedeutet (s. Abb.12).

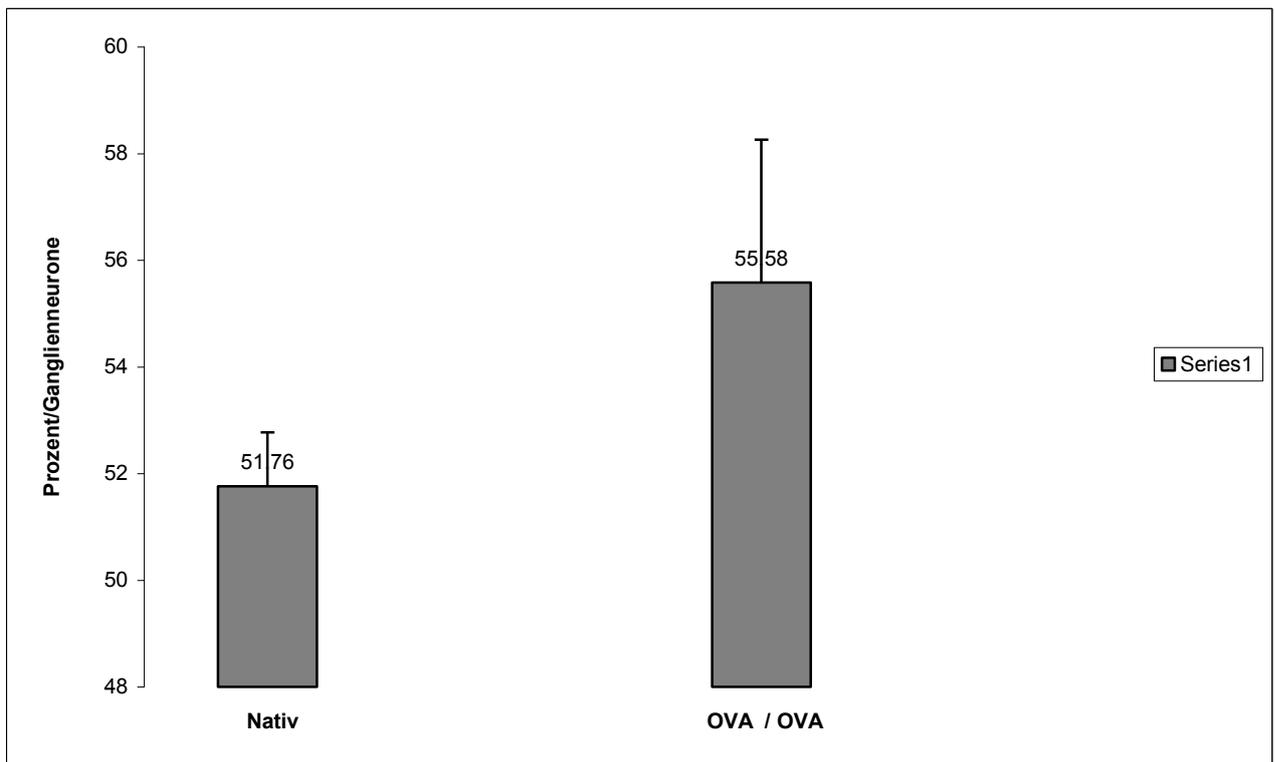
**Abbildungen und Tabellen der immunhistochemischen Analyse der sensiblen Ganglien.**



<b>Nativ</b>		<b>OVA / OVA</b>
<b>Mittelwert</b>	27,87	64,56
<b>Standardabweichung</b>	3,35	4,07

**Abbildung 10: Substanz P**

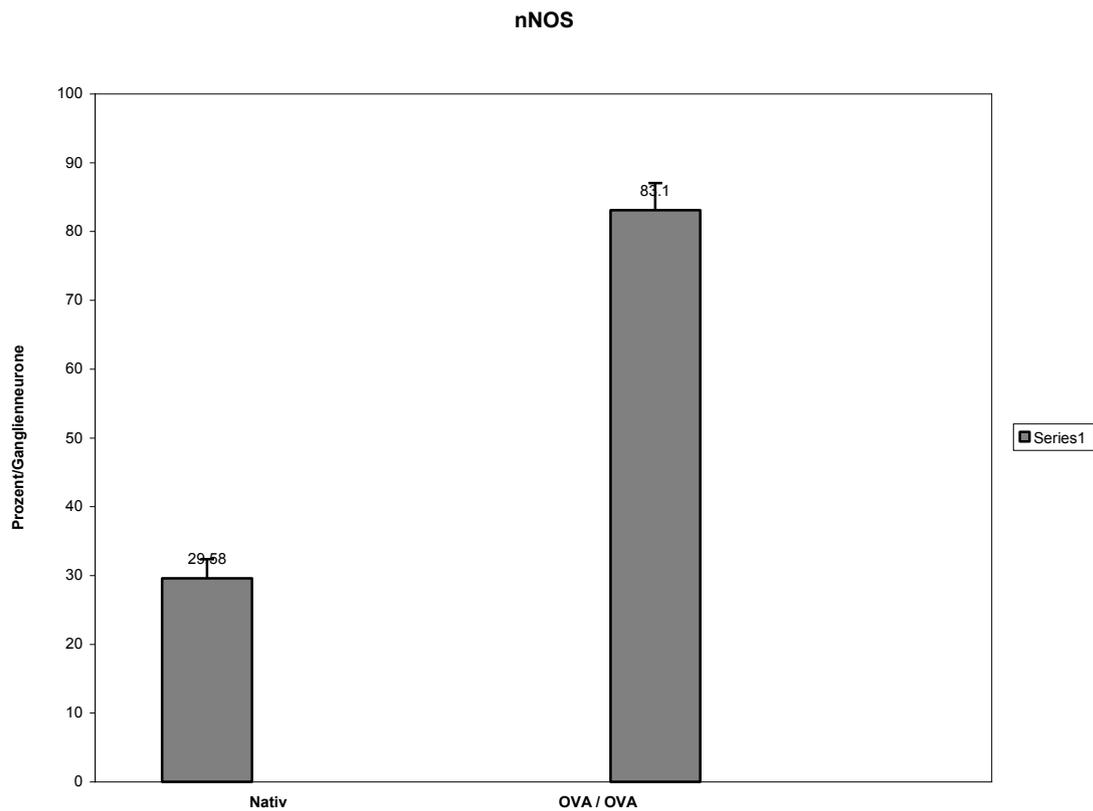
**Anteil der FG positiven Fasern im Ganglion jugulare-nodosum der beiden Versuchsgruppen, die immunhistochemischen Nachweis für eine SP-Aktivität lieferten.**



<b>Nativ</b>		<b>OVA / OVA</b>
Mittelwert	51,76	55,58
Standardabweichung	1,01	2,68

### Abbildung 11: Vanilloid-like Rezeptor VR 1

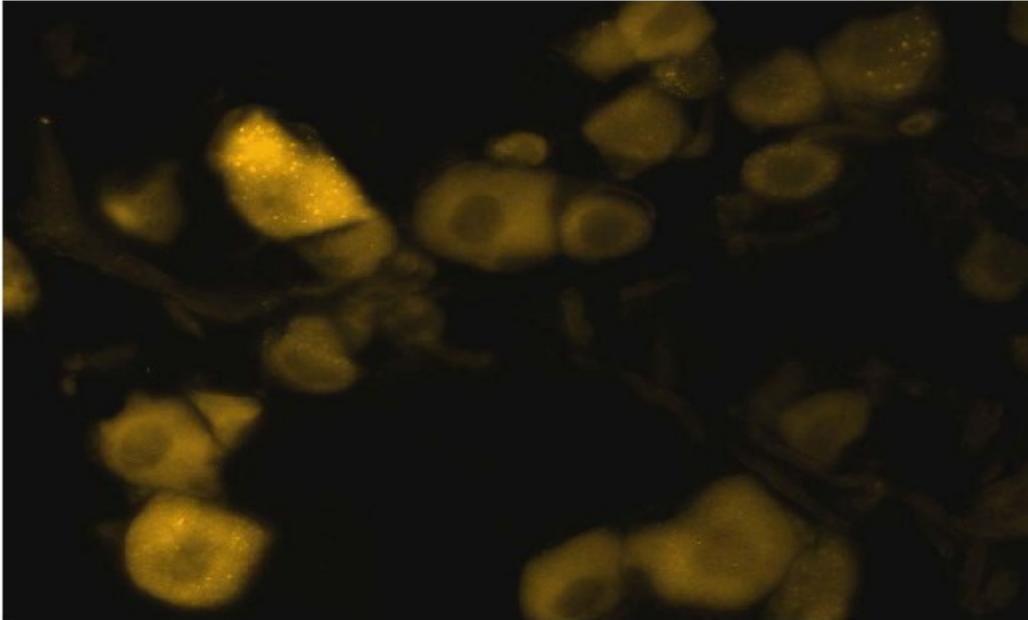
Anteil der FG positiven Fasern im Ganglion jugulare-nodosum der beiden Versuchsgruppen, die immunhistochemischen Nachweis für eine VR1 Aktivität lieferten.



<b>Nativ</b>		<b>OVA / OVA</b>
Mittelwert	29,58	83,1
Standard abweichung	2,80	3,92

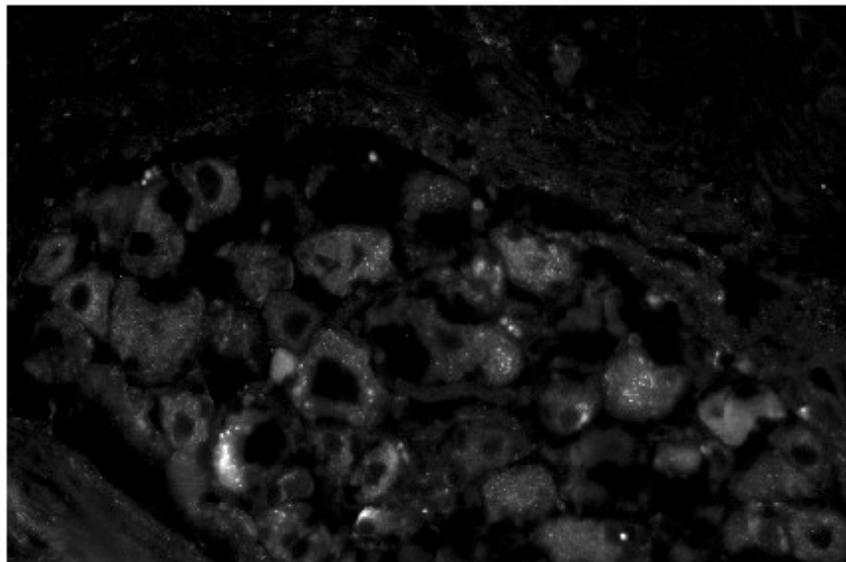
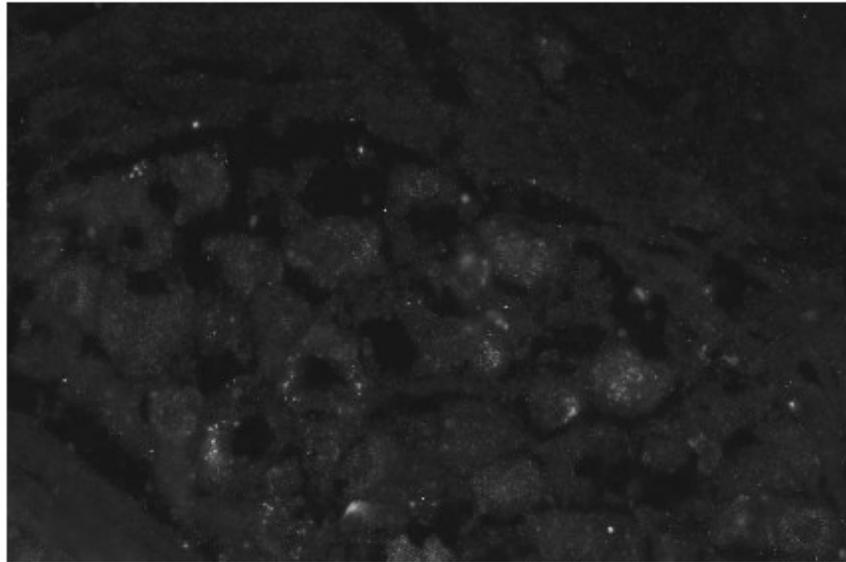
**Abbildung 12: Neuronale Stickstoffoxidase nNOS**

**Anteil der FG positiven Fasern im Ganglion jugulare-nodosum der beiden Versuchsgruppen, die immunhistochemischen Nachweis für nNOS Aktivität lieferten.**



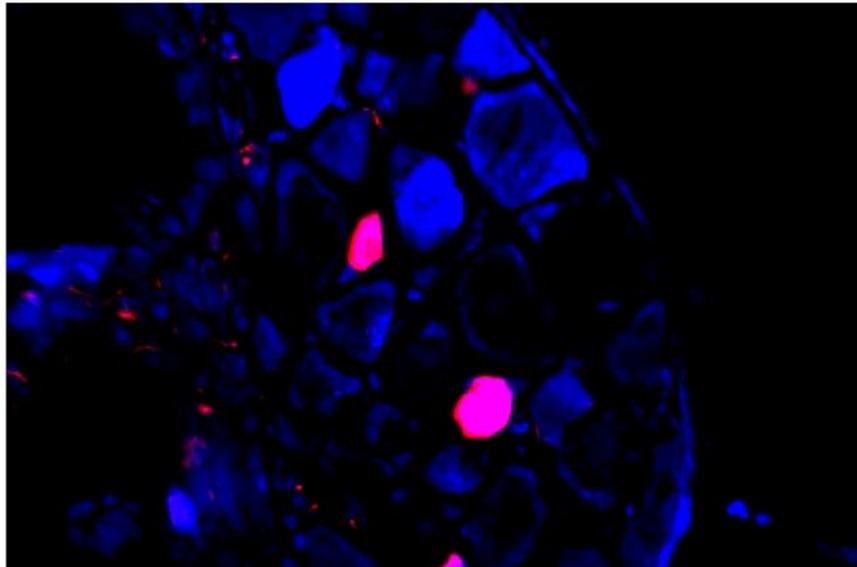
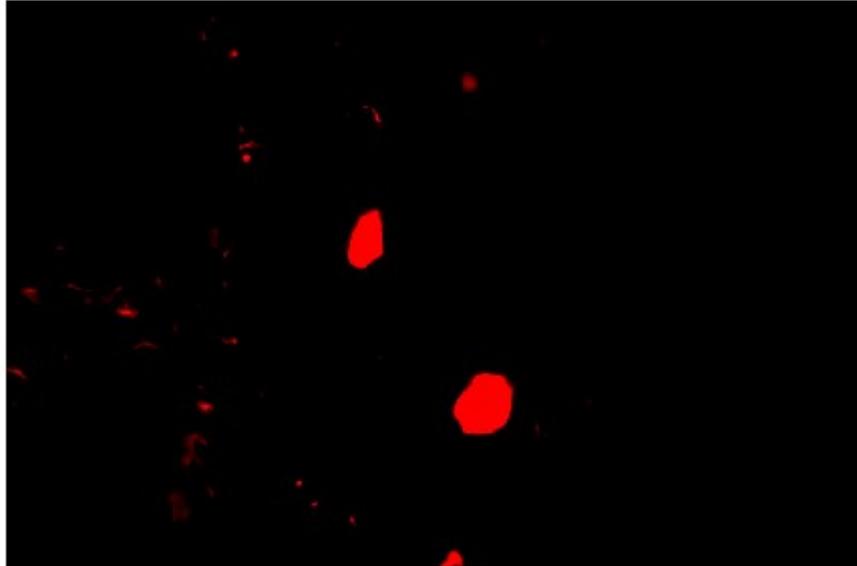
**Abbildung 13 : SP Immunhistochemie Bilder**

Abbildung einiger Ganglionzellen mit einem deutlich starken Signal des sekundären Antikörpers im Zellinneren, im Vergleich zu restlichen Perikaryen, die Antikörper negativ sind.



**Abbildung 14:VR 1 Immunhistochemie Bilder**

**Oben Abbildung des Ganglions mit FG positiven Zellen, unten nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper.**



**Abbildung 15: nNOS Immunhistochemie Bilder**

Vorinkubation mit Fluro-Gold (untere Aufnahme: mit Blaufilter) und oben Abbildung der Perikaryen mit sekundärem Antikörper.

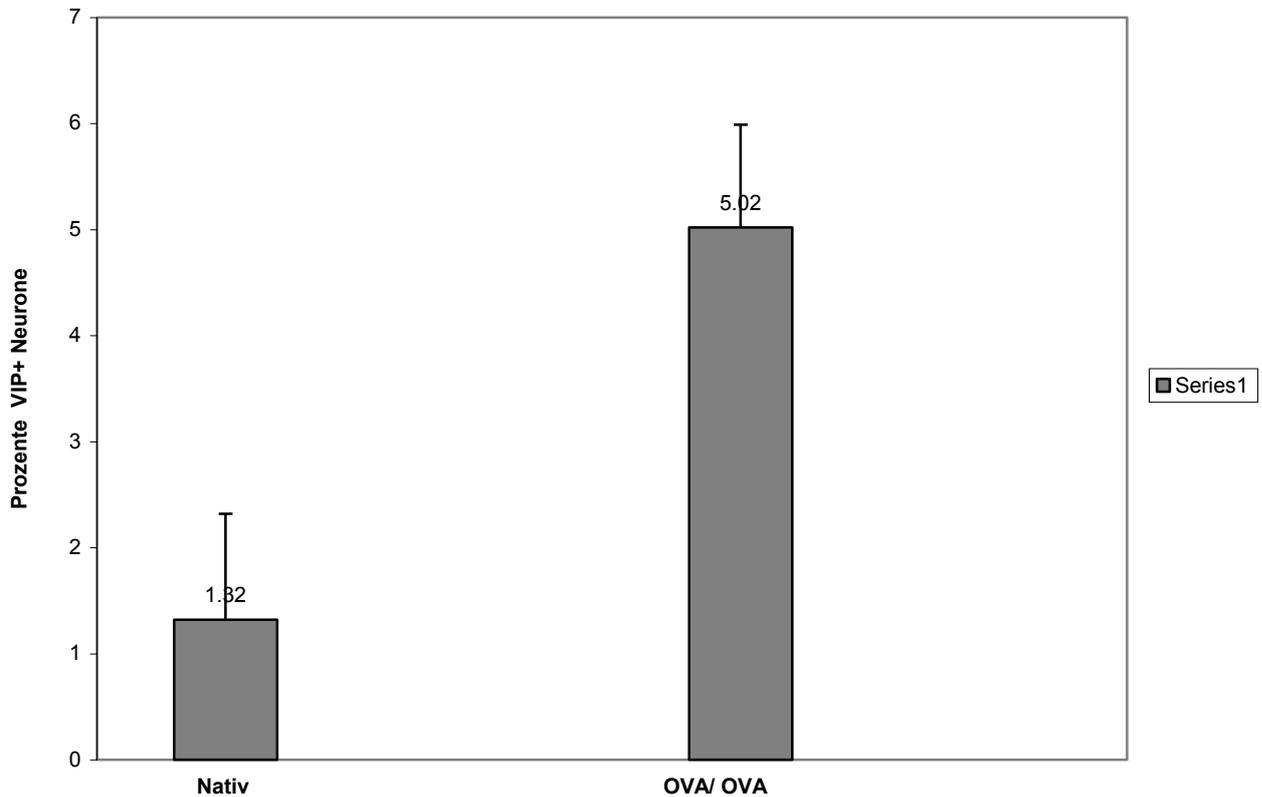
### 3.5 Retrogrades neuronales Tracing der sympathischen Innervation

Für die sympathische Innervation der Atemwege wurden Nervenfasern mit dem Nerventracer Fluro-Gold™ markiert und dann auf ihre Ursprünge untersucht. Bei der Auswertung der Atemwegsinnervation führten die immun markierten, sympathischen Nervenfasern zu ihren Perikaryen, die in den Ganglien Stellatum und Superior Cervicale (SCG) beobachtet werden konnten. Eine qualitative Analyse der Werte ergab, dass das Ganglion cervicale superius etwa 60-70 % der Perikaryen, der in die Atemwege projizierenden Fasern besaß, während die restlichen 30-40 % ihren Ursprung im Ganglion Stellatum hatten.

### 3.6 Immunhistochemische Analyse der Neuropeptide den sympathischen Ganglien

Innerhalb der Ganglien wurden die Perikaryen der dort zuführenden Nervenfasern einerseits quantitativ und andererseits auf ihre Immunreaktivität für das Neuropeptid Y (NPY) sowie das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP) untersucht. Der Analyse lagen Tiere der Gruppen nativ und OVA/OVA vor, zudem wurden einige Tiere der Kontrollgruppen OVA / - und -/OVA analysiert. Zuerst lag die Anzahl der Neurone im Ganglion Superior Cervicale höher als im Ganglion Stellatum. Darüber hinaus war die Anzahl der Neurone auf der rechten Seite höher als auf der linken, (rechts ca.7-10 %> links), dies analog zur sensiblen Innervation. Im Vergleich zwischen SCG und Ganglion Stellatum ergab sich kein signifikant, quantitativer Unterschied in der immunhistochemischen Aktivität der Neuropeptide. Dazu wurden die einzelnen Werte in der Tabelle 13 (Seite 55) gegenübergestellt und der Sachverhalt aufgezeigt. Das Neuropeptid Y zeigte durch alle Kohorten hindurch einen Anstieg in der Expression an. So wurden von 28,9 % NPY positiver Ganglienzellen bei den Tieren der Gruppe Nativ, bis auf über 62,3 % NPY positiver Perikaryen bei der Gruppe OVA / OVA festgestellt (Abb.18,19). Dieses ist gleichwertig mit einem stark signifikanten Anstieg der NPY-Expression in den Ganglien auf über das 2,2fache des Ausgangswertes. Die Analyse des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids (VIP) ergab, dass zwischen den intraperitoneal sensibilisierten Tieren (OVA/-) und den inhalativ provozierten (-/OVA) kein signifikanter Unterschied bestand. Jedoch war der Anstieg der Expression von 1,7 % der Ganglienzellen bei den nativen, unbehandelten Tieren im Vergleich zur Versuchsgruppe OVA/OVA mit 4,7 % VIP positiven Zellen beachtlich. Dies entsprach einer Steigerung von 2,7 fachen des Ausgangswertes (Abb.16, 17). Immunfluoreszenz-aufnahmen finden sich in den Abbildungen 20 und 21.

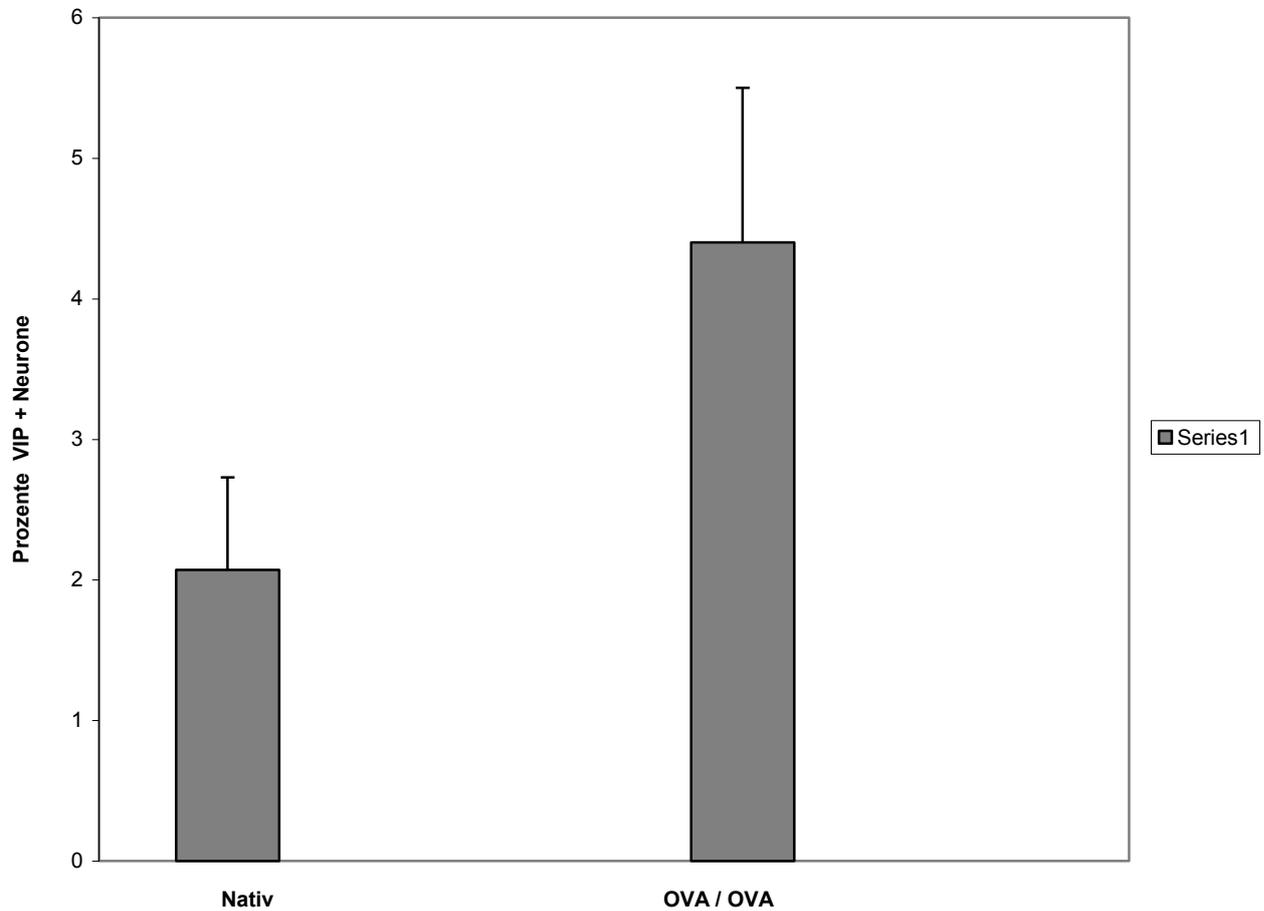
Abbildungen der statistischen Analysen der sympathischen Innervation



<b>Nativ</b>		<b>OVA / OVA</b>
Mittelwert	1,32	5,02
Standardabweichung	1	0,97

**Abbildung 16: VIP im Gaglion Cervicale superior**

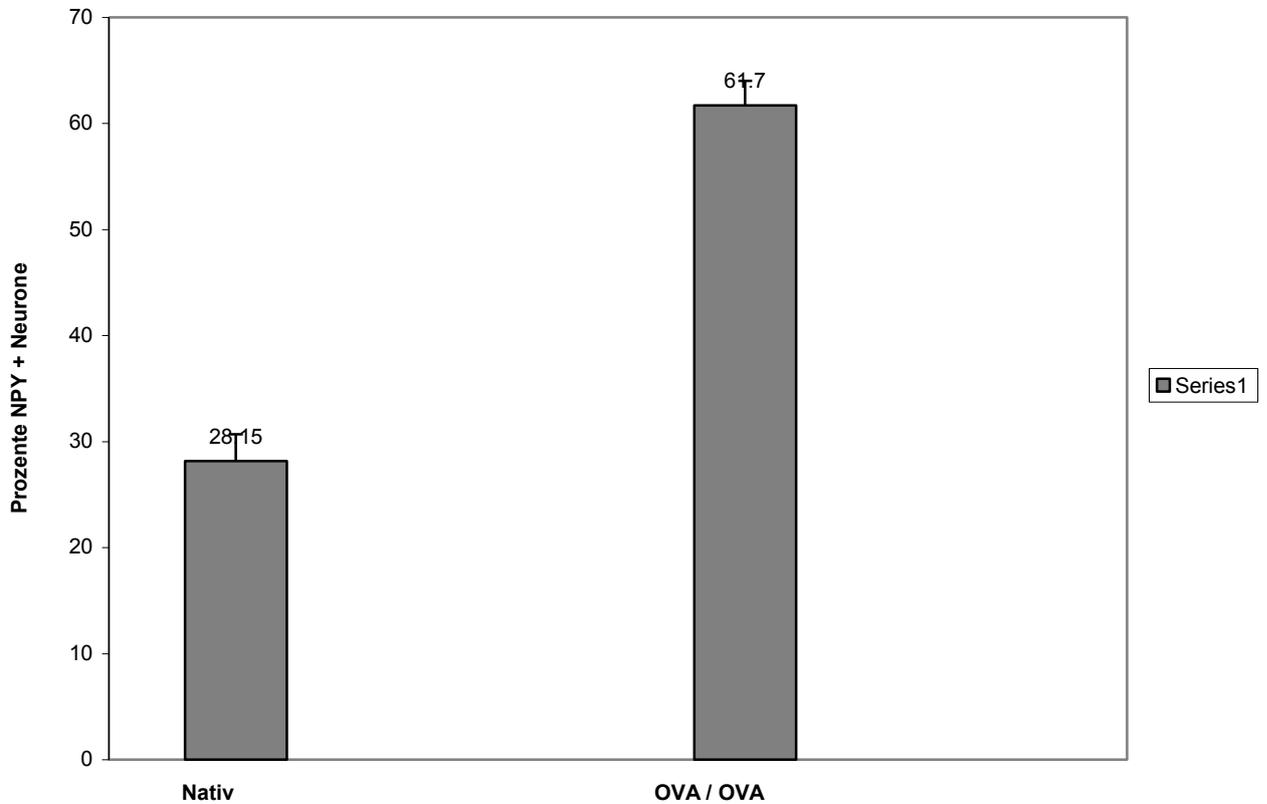
**Anteil der FG positiven Fasern im Ganglion cervicale superior der beiden Versuchsgruppen, die immunhistochemischen Nachweis für eine VIP-Aktivität lieferten.**



Nativ		OVA / OVA
Mittelwert	2,07	4,4
Standardabweichung	0,66	1,1

**Abbildung 17: VIP Ganglion Stellatum**

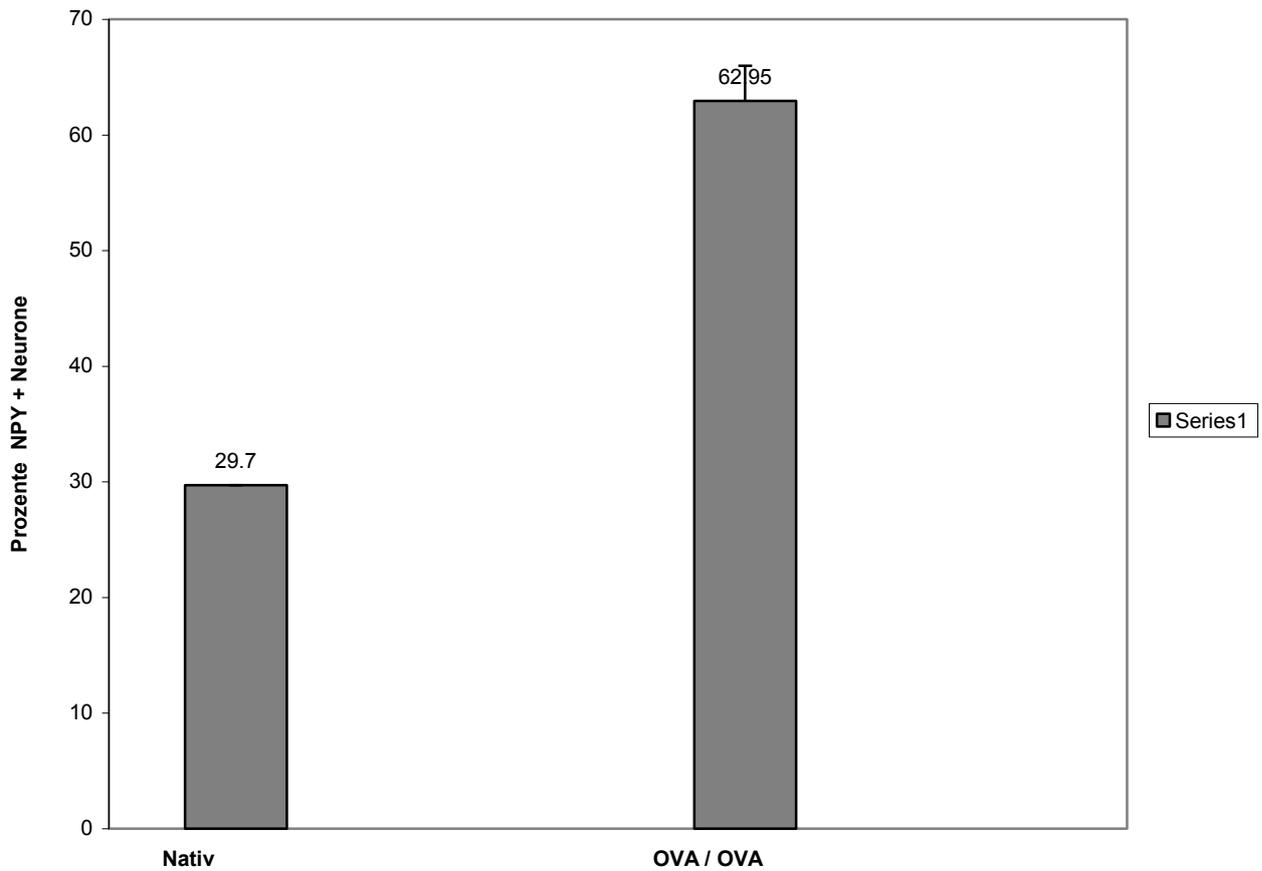
**Anteil der FG positiven Fasern im Ganglion Stellatum der beiden Versuchsgruppen, die immunhistochemischen Nachweis für eine VIP-Aktivität lieferten.**



<b>Nativ</b>		<b>OVA / OVA</b>
Mittelwert	28,15	61,7
Standard abweichung	2,52	2,3

**Abbildung 18: NPY im Ganglion cervicale superior**

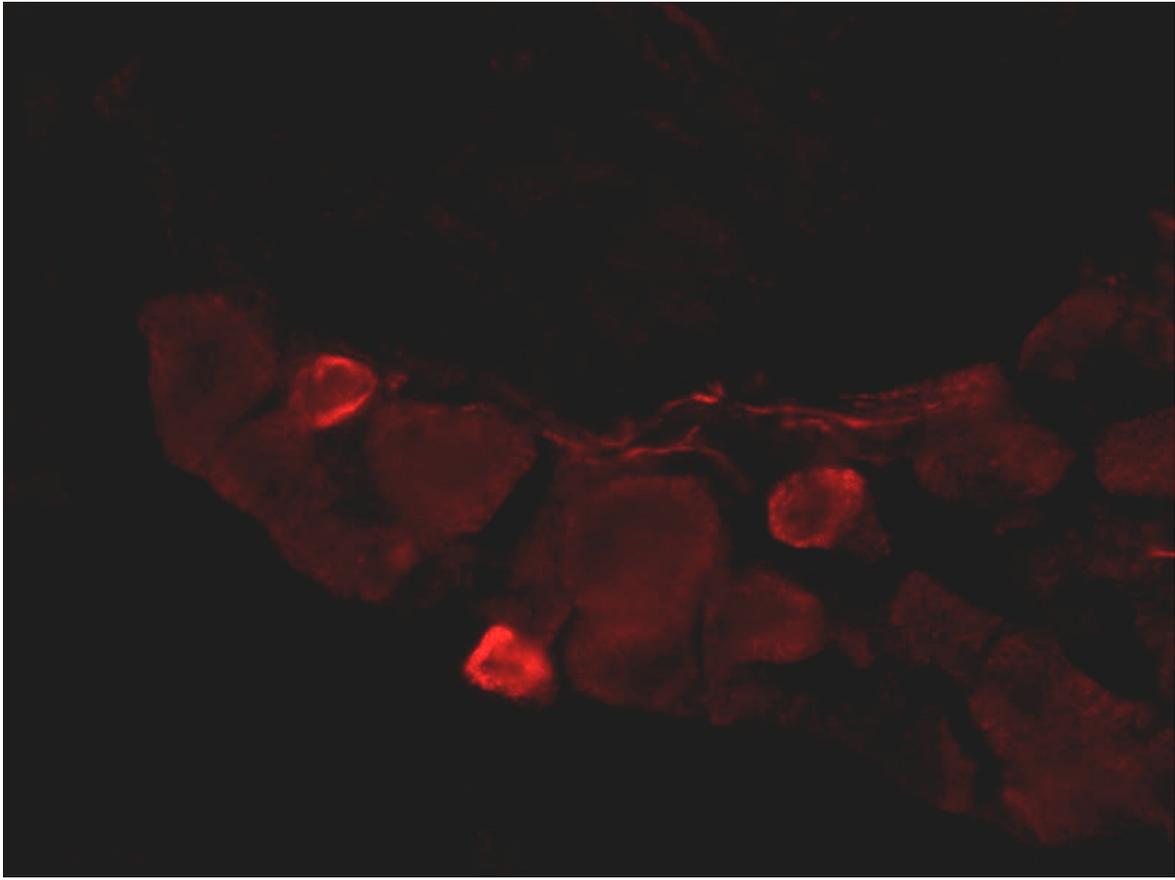
**Anteil der FG positiven Fasern im Ganglion cervicale superior der beiden Versuchsgruppen, die immunhistochemischen Nachweis für eine NPY-Aktivität lieferten.**



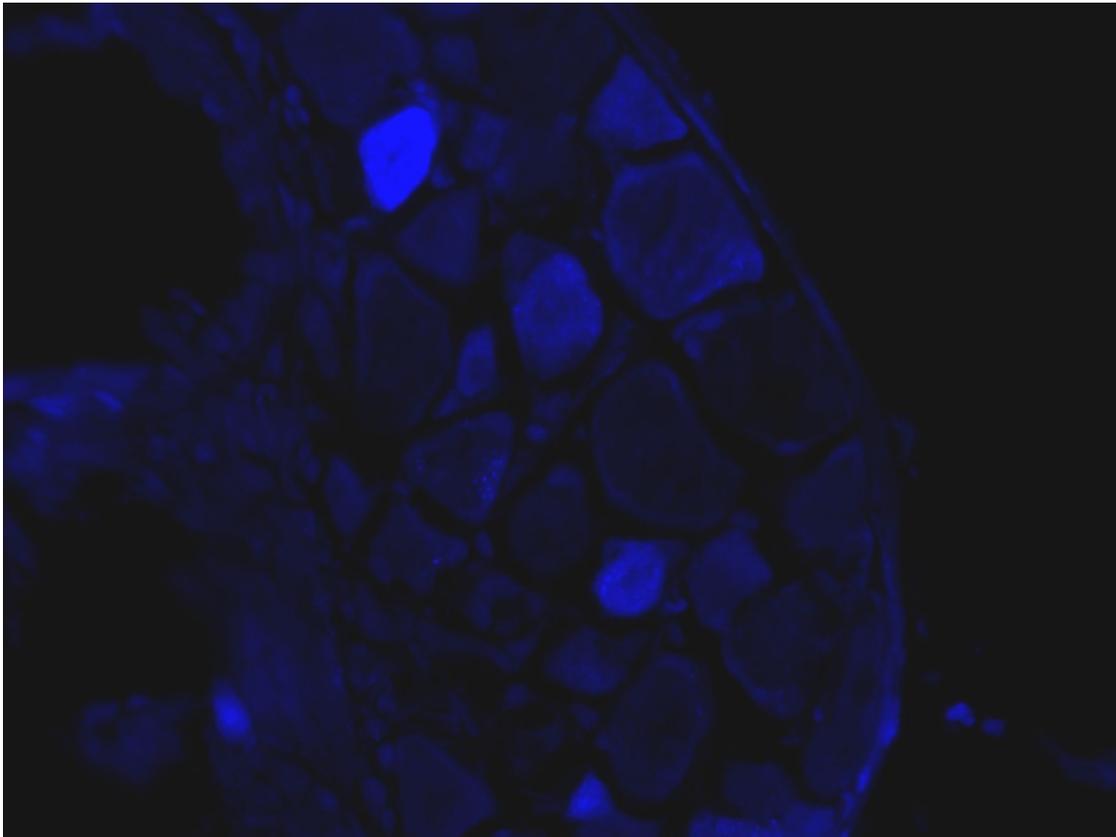
<b>Nativ</b>		<b>OVA / OVA</b>
Mittelwert	29,7	62,95
Standardabweichung	1,12	3,01

**Abbildung 19: NPY Stellatum Ganglion**

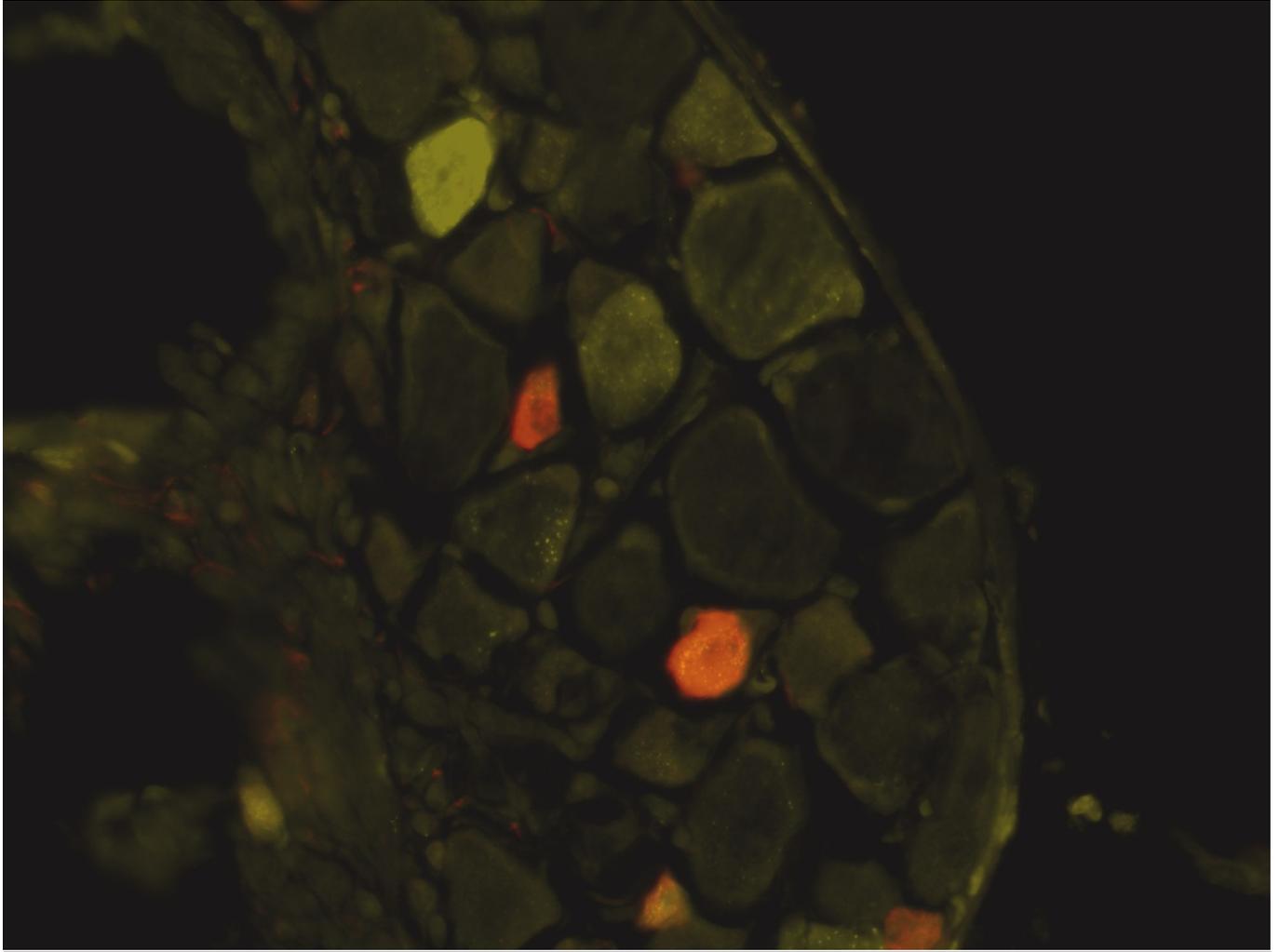
**Anteil der FG positiven Fasern im Ganglion Stellatum der beiden Versuchsgruppen, die immunhistochemischen Nachweis für eine NPY-Aktivität lieferten.**



**Abbildung 20: Teilaufnahme vom Ganglion Cervicale superior mit Darstellung Immunfluoreszenz positiver NPY Zellen.**



**Abbildung 21: VIP Immunhistochemie SCG, Stellatum (a)**  
**Immunfluoreszenz-Aufnahme des Ganglions nach Inkubation mit Fluro-Gold™,**  
**gefolgt von der Aufnahme nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (s.S.49)**



**Abbildung 22: VIP Immunhistochemie SCG, Stellatum (B)**

**Aufnahme nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper**

### 3.7. Statistische Auswertung

Die Analyse der Werte wurde mit SPSS™ Version 12. 0.2. vorgenommen. Die Signifikanzen wurden mittels nicht-parametrischer Tests, wie dem Mann-Whitney-Test ausgerechnet. Die Verläufe und Trends der Versuchswerte im Jonckheere–Terpstra–Test wurden in Tabelle 7 dargestellt. Die Ergebnisse wurden nach Validität und statistischer Richtigkeit vom Institut für Statistik der Charité Campus Mitte überprüft.

#### Jonckheere-Terpstra-Test (a)

	SP	VR_1	NNOS	VIP	NPY
Anzahl der Stufen in allen Gruppen	4	4	4	4	4
N	44	44	44	48	48
Beobachtete J-T-Statistik	704.000	537.500	701.000	748.500	839.000
Mittelwert der J-T-Statistik	354.000	354.000	354.000	420.000	420.000
Standardabweichung der J-T-Statistik	47.338	47.318	47.344	53.810	53.819
Standardisierte J-T-Statistik	7.394	3.878	7.329	6.105	7.785
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>.000</b>	<b>.000</b>	<b>.000</b>	<b>.000</b>	<b>.000</b>
<b>p=</b>					

**Tabelle 7: Signifikanz der Wertverläufe insgesamt (vergleich aller Versuchsgruppen untereinander)**

Gruppe		SP	VR1	nNOS	VIP	NPY
<b>1. Nativ</b>	N Gültig	10	10	10	10	10
	Mittelwert	27.8788	51.7600	29.589	1.7000	28.934
	Standardabw.	3.35344	1.01599	2.8086	0.8937	2.0183
	Minimum	23.90	50.00	26.30	0.00	25.30
	Maximum	32.40	53.30	33.30	2.80	31.50
	Perzentile 25	24.400	50.975	27.250	1.1750	27.875
	50	28.035	52.090	29.130	1.5050	29.000
75	31.350	52.275	32.563	2.5900	30.660	
<b>2. OVA / OVA</b>						
N Gültig	16	16	16	16	16	
Mittelwert	64.5906	55.5831	83.108	4.7150	62.326	
Standardabw.	4.07996	2.68157	3.928	1.0914	2.6900	
Minimum	57.10	51.11	75.00	2.81	57.10	
Maximum	73.20	59.72	88.60	6.06	67.00	
Perzentile 25	61.675	53.605	80.250	3.8600	59.925	
50	64.970	55.600	84.150	5.0500	62.850	
75	66.920	57.950	85.575	5.7725	64.425	

**Tabelle 8: Statistik und Zusammenfassung der Versuchsgruppen**

	<b>NATIV Mittelwert</b>	<b>OVA/OVA Mittelwert</b>	Z	<b>p 1</b>	<b>p 2</b>
<b>SP</b>	27.87	64.59	- 3.89	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
<b>VR1</b>	51.76	55.58	- 2.39	<b>0.0084</b>	<b>0.001</b>
<b>nNOS</b>	29.589	83.108	- 3.89	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
<b>VIP</b>	1.7	4.71	- 3.89	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
<b>NPY</b>	28.93	62.326	-3.89	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>

**Tabelle 9: Statistischer Vergleich, Signifikanz der Versuchsgruppe Nativ vs OVA/OVA  
Mann-Whitney Test**

### Statistik für Kontrollgruppen I

	SP	VR_1	NNOS	VIP	NPY
Mann-Whitney-U	. 000	31.500	. 000	25. 000	. 000
Wilcoxon-W	36. 000	86.500	36. 000	80. 000	55. 000
Z	-3.556	-.757	-3.554	-1.890	-3.781
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	. 000	.449	. 000	. 059	. 000
<b>Exakte Signifikanz [2* (1-seitig Sig.)] p =</b>	<b>. 000 (a)</b>	<b>.460 (a)</b>	<b>. 000 (a)</b>	<b>. 063 (a)</b>	<b>. 000 (a)</b>

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: GRUPPE1

**Tabelle 10: Vergleich zwischen den Kohorten Nativ und -/OVA (Kontrolle 1).**

### Statistik für Kontrollgruppen II

	SP	VR_1	NNOS	VIP	NPY
Mann-Whitney-U	3.000	19.000	.000	21.500	.000
Wilcoxon-W	58.000	74.000	55.000	76.500	55.000
Z	-3.556	-2.347	-3.780	-2.156	-3.781
Asymptotische					
Signifikanz (2-	.000	.019	.000	.031	.000
seitig)					
<b>Exakte</b>					
<b>Signifikanz [2*</b>					
<b>(1-seitig Sig.)] p</b>	<b>.000 (a)</b>	<b>.019 (a)</b>	<b>.000 (a)</b>	<b>.029 (a)</b>	<b>.000 (a)</b>
<b>=</b>					

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: GRUPPE1

**Tabelle 11: Vergleich zwischen den Kohorten -/OVA (Kontrolle 1) und OVA/- (Kontrolle 2).**

### Statistik für Kontrollgruppen III

	SP	VR_1	NNOS	VIP	NPY
Mann-Whitney-U	1. 000	54. 000	7. 000	28.500	1. 000
Wilcoxon-W	56. 000	109. 000	62. 000	83.500	56. 000
Z	-4.166	-1.371	-3.848	-2.950	-4.267
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	. 000	.170	. 000	. 003	. 000
<b>Exakte Signifikanz [2* (1-seitig Sig.)] p =</b>	<b>. 000 (a)</b>	<b>.182 (a)</b>	<b>. 000 (a)</b>	<b>. 002 (a)</b>	<b>. 000 (a)</b>

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: GRUPPE1

**Tabelle 12: Vergleich zwischen den Kohorten OVA/- (Kontrolle 2) und OVA/OVA.**

SCG	Stellatum
VIP nativ	VIP nativ p = 0,22
VIP OVA / _	VIP OVA / - p= 0,841
VIP - / OVA	VIP - / OVA p= 0,99
VIP OVA / OVA	VIP OVA / OVA p= 0,27

SCG	Stellatum
NPY nativ	NPY nativ p = 0,548
NPY OVA / -	NPY OVA / _ p = 0,31
NPY - / OVA	NPY - / OVA p= 0,548
NPY OVA / OVA	NPY OVA / OVA p = 0,34

**Tabelle 13: Anhang: Gegenüberstellung und Signifikanz zwischen SCG und Stellatum**

## **4. Diskussion**

### 4.1 Ratte als Versuchstier

Die Ratte stellt seit Langem ein wichtiges Versuchs- und Untersuchungsobjekt dar. Neben dem sehr ähnlichen anatomischen Aufbau der Atemwege besticht die weitgehende Ähnlichkeit mit den physiologischen Daten des Menschen. Bisherige Beobachtungen an Ratte und Mensch ergaben zudem eine weitgehende Übereinstimmung in der Pharmakokinetik sowie der Enzymaktivität (145). Die Brown Norway Ratte wird in unserem Labor seit Langem als erfolgreiches Untersuchungsobjekt verwendet.

### 4.2 Histopathologisches Bild

Mithilfe der HE-Färbungen wurden die Atemwege der untersuchten Tiere dargestellt. Dabei konnten deutliche Unterschiede im histologischen Aufbau der Untersuchungsproben verzeichnet werden. Die Kriterien nach denen histologischen Schnitte untersucht wurden, entstammen der pathologischen Klassifikation des Cornell Medical College, New York und den Richtlinien der königlichen Gesellschaft für Pathologie zu London. Danach galten als Kriterien für eine entzündliche Reaktion der Nachweis einer Bronchokonstriktion, Hyperplasie der glatten Muskulatur, Drüsenhyperplasie, Verdickung der Basalmembran und die Einwanderung der Granulozyten und Lymphozyten in das Gewebe. Das Ausmaß dieser inflammatorischen Befunde nahm erwartungsgemäß, je nach Stärke der Provokation der Versuchstiere mit Ovalbumin zu. Das Vollbild einer entzündlichen Reaktion, ähnlich dem der Veränderungen beim Asthma bronchiale wurde besonders in der Versuchsgruppe OVA / OVA sichtbar.

Hierbei traten die starke Bronchokonstriktion, Verdickung der Basalmembran sowie die deutlich sichtbare Infiltration der Atemwege mit immunkompetenten Zellen in den Vordergrund. Dies alles könnte zu der Annahme führen, dass die in dieser Studie vorgenommene Ovalbuminprovokation durchaus mit starken histologisch-reaktiven Vorgängen in den Versuchstieren einherging.

### 4.3 Immunglobulin E Bestimmung

Die Konzentration des Ovalbumin –spezifischen Immunglobulin E (IgE) erreichte bei den Versuchstieren der Gruppe OVA / OVA das 70 fache des Ausgangswertes. Diese Tatsache und der deutliche Unterschied zu den IgE-Spiegeln der Vergleichsgruppen könnten auf eine hohe Reaktivität der Tierorganismen gegenüber der verwendeten Noxe (Ovalbumin) hinweisen. Eine ausreichende Sensibilisierung und Provokation der Tiere konnte aufgrund dieser Beobachtung postuliert werden.

Auffällig war die Diskrepanz der Werte zwischen der Kontrollgruppe I (OVA /-) und OVA/OVA einerseits und den Tieren der Gruppen Nativ und - / OVA (Kontrollgruppe II) andererseits. Dabei war festzustellen, dass die Gruppen -/ OVA und Nativ nicht sensibilisiert wurden und ihre IgE–Spiegel nicht über 10 LU anstiegen. Hingegen zeigten die Gruppen OVA /OVA und OVA / -, nach einer intraperitonealen Verabreichung und Sensibilisierung mit Ovalbumin einen Anstieg von IgE auf über 230 LU. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die intraperitoneal vorgenommene Sensibilisierung mit dem hochpotenten Allergen Ovalbumin sein. Dieses Protein einst über die Resorption im Peritoneum in die Blutbahn gebracht, könnte möglicherweise eine systemische Allergen-Wirkungs-Komponente induziert haben. Andererseits wurde über die Lungenperfusion das respiratorische System mit dem Ovalbumin-Allergen viel genauer und eindringlicher in Kontakt gebracht, als es inhalativ (Gruppe -/OVA) je möglich wäre.

Die Wirkungskraft des Allergens Ovalbumin auf unsere Versuchstiere fand unter anderem in der starken Sekretion des Immunglobulins E Ausdruck. Die einzelnen immunologischen Schritte der IgE-Sekretion sind Gegenstand zahlreicher Abhandlungen gewesen. In diesen geht man von der Reaktion des Allergens Ovalbumin mit den im Blut zirkulierenden B-Lymphozyten, die dann eine Immunkomplexbildung aus B- und T-Lymphozyten verursacht. Dabei freiwerdenden Immunmodulatoren bewirken eine Freisetzung des Immunglobulins E (IgE). Demnach kann postuliert werden, dass das IgE unter anderem eine Histamin- und Leukotriensekretion bei den Versuchgruppen verursachte, die dann zu akutem Bronchospasmus, Ödem führte und in der Spätfolge eine verstärkte Atemwegentzündung und Reaktivität des bronchialen Systems nach sich zog. (1)

Die bei der Versuchsauswertung gefundenen, hohen Plasma - IgE-Spiegel mit einem Anstieg von mehr als 70fachen des Ausgangswerts scheinen diese ausgesprochen heftige Reaktion der Versuchstiere auf das Allergen zu belegen.

Klinisch bedeutsam wird diese Beobachtung im Zusammenhang mit Studien, die die Schwere des Asthmas in unmittelbarer Beziehung zu dem im Blut zirkulierenden ImmunglobulinE-Spiegel sehen (9, 108).

Stellt man die histologischen Befunde und die labortechnische gemessenen Immunglobulin-Spiegel zusammen, so zeigte sich in dieser Studie eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausmaß an histologischer Schädigung und dem Anstieg der Immunglobulinkonzentration bei den Versuchstieren.

Daraufhin kann postuliert werden, dass die Sensibilisierung und Challenge der Versuchstiere einen signifikanten Anstieg der immunologischen Parameter (IgE) nach sich zog.

Folglich stellten einerseits der Grad der Veränderungen im histopathologischen Bild und andererseits die direkte Korrelation mit signifikant ansteigenden Immunglobulin-Spiegel einen Beweis für die ausreichende methodische Behandlung der Tiere. Ferner wurde dadurch die im Versuchsaufbau angenommene Entwicklung einer schweren entzündlichen Reaktion in den Atemwegen der Brown Norway Ratte induziert und bestätigt.

#### 4.4 Sensible Innervation

Die zurzeit in der Literatur vorliegenden Arbeiten bestätigten die Ergebnisse von Kummer und Fischer, bezüglich der sympathischen und sensiblen Ganglien und der zu den Atemwegen ziehenden Neurone (55). Bei verwandten Spezies konnte auch eine ähnliche Lokalisation des sensiblen Innervationsursprungs der Atemwege, analog dem Meerschweinchen und der Maus gezeigt werden (111,112). Im Rahmen dieser Studie wurde nach dem Ursprung der sensiblen Innervation der Atemwege der Brown Norway Ratte gesucht. Die Auswertung ergab, dass die mit dem Immuntracer Fluro-Gold™ retrograd angefärbten Neurone, ihre Perikaryen im Ganglion jugulare und Ganglion nodosum hatten. Dies führte zu der Hypothese, dass der Ursprung der die Atemwege versorgenden sensiblen Nervenfasern im Ganglion jugulare und nodosum liege. Dies würden die zahlreichen Studien an den anderen Spezies bestätigen (112). Hunter und Udem beschrieben in einer Studie an Meerschweinchen, dass die die Atemwege versorgenden sensorischen Neurone nahezu exklusiv aus dem Ganglion jugulare und in kleinerem Maße aus dem Ganglion Nodosum projizieren (109, 110) . Bei der Ziege fanden Kang and Lee etwa 60 Prozent der Perikaryen im Ganglion Nodosum und 40 Prozent im Ganglion jugulare(111) . Anhand retrograder Studien der Substanz P konnte Ihikawa den Ursprung der sensiblen Neurone ebenso im Ganglion jugulare der Ratte vermuten (112, 113,114). In dieser Studie konnte eine bilaterale Anfärbung der Perikaryen in Ganglien Jugulare und nodosum mit dem neuronalen Tracer Fluro-Gold gezeigt werden. Da die Ganglien aus anatomischen Gründen als Paket entnommen und auch so ausgewertet wurden, war keine direkte qualitative Aussage erlaubt, ob nun das Ganglion jugulare oder nodosum mehr Tracer aufnimmt. Es zeigte sich jedoch ein diskreter Trend, dass im rechten Ganglion jugulare-nodosum mehr retrograd markierte Neurone als im linken Ganglionpaket zu verzeichnen waren (rechts ca.7-10 %> links). Ob die Häufung auf der rechten Seite deswegen erfolgte, weil auch rechts der Tracer installiert wurde oder dieser akzidentiell in den linken Bronchus beispielsweise durch Aspiration oder Husten gelangte, blieb jedoch offen.

Bisher fehlen auch zu dieser Frage quantitative, stichhaltige Studien.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die retrograd tracergefärbten Nervenfasern mit ihren Perikaryen ins Ganglion jugulare Nodosum zurückverfolgt werden. Dies spricht dafür, dass die sensible Innervation der Atemwege der Ratte ebenso aus dem Ganglion Jugulare und Ganglion Nodosum ihren Ursprung nimmt.

#### 4.5 Sympathische Innervation

Aus den bislang veröffentlichten Arbeiten ging keine Beschreibung des Ursprungs der die Atemwege versorgenden sympathischen Nervenfasern bei der Ratte hervor. In den Arbeiten von Tajti et al (115) und bei Marx et al (116) konnten beim Menschen mehrmals das Ganglion Cervicale Superior (SCG) als Ursprung der sympathischen Innervation postuliert werden. Um den Nachweis der sympathischen Innervation bei der Brown Norway Ratte zu erbringen, wurde der Fluro-Gold™ Tracer in den rechten Hauptbronchus injiziert. Die angefärbten Fasern ließen sich auch ins Ganglion Stellatum und SCG zurückverfolgen.

Nach Entnahme und Inkubation der Ganglien Stellatum und des Cervicale superius der rechten Seite wurden die Perikaryen der dahin projizierenden Fasern zusätzlich quantitativ ausgewertet. Die bereits oben erwähnte Mehrzahl der Neuronen befand sich im Ganglion cervicale superius. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser retrograd-immunhistochemischen Studie das Ganglion Cervicale Superior als der Hauptursprungsort der postganglionären, sympathischen Nervenfasern beschrieben werden.

Zahlenmäßig nachgeordnet zeigte sich das Ganglion Stellatum, welches ebenso die Atemwege sympathisch innerviert. Eine kürzlich publizierte Studie von Richardson fand FastBlue-Tracer positive sympathische Nervenfasern im medialen Anteilen des Ganglion Stellatum der Ratte. Dies würde meine getroffene Aussage ebenso unterstützen (146).

## 4.6 Neuropeptide und die induzierte Inflammation der Atemwege

### 4.6.1. Substanz P

Die Substanz P wurde als eines der bestbeschriebenen Tachykinine auch im Rahmen dieser Studie nachgewiesen. Die Auswertung ergab eine ansteigende Expression, die vom Grad der Ovalbumin –Provokation abhängig war. So wurde eine Zunahme der Substanz P positiven Zellen im Ganglion jugulare/nodosum von 28 Prozent bei unbehandelten, nativen Tieren auf 65 Prozent der Perikaryen bei sensibilisierten und gechallengten Ratten der Gruppe OVA/OVA verzeichnet. Dieser Anstieg wurde ebenfalls in dieser Größenordnung von Nieber beschrieben (117,118). Darin wurde in der Broncho-alveolären Lavage (BAL) von allergischen Patienten ein Anstieg der Substanz P-Konzentration um 40 % gefunden. Dieser Befund konnte auch in dieser - Studie an der Brown Norway Ratte bestätigt werden. Die Anzahl der SP positiven Fasern stieg mit dem Grad der Allergen-induzierten Belastung an. Versuchstiere mit einer maximalen Reizung mit der Noxe Ovalbumin reagierten mit den stärksten Anstiegen der Substanz P- Expression.

Die Substanz P beeinflusst als Neuropeptid zahlreiche, komplexe immunologische und physiologische Reaktionen. Wichtig für diesen Versuch erschien die Beziehung zwischen der Allergisierung und der Freisetzung von Tachykininen, auf die im Folgenden eingegangen wird. Die bereits erläuterten histopathologischen Befunde mitsamt des starken Anstiegs des IgE deuten auf eine starke entzündliche Reaktion der Atemwege bei den Versuchstieren. Das Ovalbumin-spezifische Immunglobulin E erwies sich dabei als besonders plakativer Marker für die Provokation mit dem Allergen. Die sich daraus leitende lokale Entzündungsreaktion beeinflusste nicht nur die residenten immunologischen Zellen, sondern auch das lokale Gewebs-pH und Freisetzung von Botenstoffen, wie hier insbesondere der Substanz P.

Eine Entzündungssituation samt Änderungen in der Gewebsphysiologie führen konsekutiv zu einer Reizung der versorgenden sensiblen Nerven, meistens C-Fasern, die als afferente Leitung diese Nachricht an das zentrale Nervensystem (ZNS) leiten. Die genauen Abläufe der Aktionspotentialsauslösung infolge der entzündlichen Nervenirritation sind noch ungeklärt.

Bekannt ist allerdings, dass die C-Faser Nozizeptoren neben ihrer afferenten, impulsleitenden auch lokale, efferente Funktionen, wie Vasodilatation, Plasmaextravasation vermitteln. Hinzu kommt die Modulation neuronaler Aktivität, die durch Freisetzung der Neuropeptide wie Substanz P und Neurokinin A an der peripheren Endigung ausgelöst werden kann (119) .

Solvay stellte dabei die Hypothese auf, in der ein nervaler Reiz zu einer antidromen Freisetzung von Tachykinen und zur Erhöhung der PPTa-Gen-Expression führte. Dieses PPTa-Gen induziert die Substanz P-Bildung (120). Substanz P wurde aufgrund der zahlreichen Wirkungen dem eNANC System zugeordnet. Die dabei entstehenden Reaktionen schienen über den Neurokinin-1-Rezeptor vermittelt zu werden. In der Literatur wurde bei der Ratte und Maus eine Substanz P assoziierte Erhöhung der Plasmaextravasation (121, 122), verstärkte Histaminsekretion, Mastzell-Aktivierung mit anschließender IgE und pro-inflammatorischer Interleukinausschüttung beschrieben (50).

Dies würde meine Beobachtungen in dieser Studie bestätigen.

Die klinische Relevanz dieser Prozesse zeigt sich vor allem, bei der Betrachtung der Lokalisation der Substanz P-haltigen Nervenfasern. Neben der Lamina Propria und den mukösen Drüsen durchziehen diese Fasern auch die bronchiale glatte Muskulatur und die Gefäße und können so an verschiedenen Orten ihre Wirkung entfalten (123,124) .Neben der stark bronchokonstriktorischen Wirkung, wird auch eine erhöhte Mukusproduktion mit Zunahme des Gewebsödems und eine chemotaktische Wirkung auf die Zellen des Immunsystems, die besonders proinflammatorisch sind postuliert (125, 126). Dies betrifft insbesondere die Mastzellen und die Einwanderung der Eosinophilen- ins Entzündungsgebiet (127,128). Die Atemwege reagieren darauf mit einem Ödem der Schleimhaut und einer deutlichen Verstärkung der Entzündung, wie sie auch in den histopathologischen Aufnahmen dieser Arbeit deutlich wurde (129).

Zusammenfassend konnte auch in diesem Experiment die Schlagkraft und die vielfältigen Einflüsse der Substanz P auf eine Entzündung der Atemwege beobachtet werden. Der starke Anstieg der Substanz P- Konzentrationen in dieser Studie könnte das Bild einer schweren bronchoinflammatorischen Reaktion bewirkt haben. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Provokation der Versuchstiere mit dem Allergen Ovalbumin eine starke Tachykinin antwort nach sich zieht, die in einem in-vivo Ratten Modell zu einer schweren respiratorischen Entzündungsreaktion führen kann.

#### 4.6.2 Vanilloid-like Rezeptor (VR1)

Nahezu in allen Versuchsgruppen war gleichermaßen etwa die Hälfte (51-56 %) der Ganglienzellen im Ganglion Jugulare-nodosum positiv für Vanilloid-like Rezeptor (VR 1).

Diese Befundkonstellation erschien erstaunlich, insbesondere wenn man die Funktion des VR1 Rezeptors für Capsaicin betrachtet. Dieser ist ein starker Schmerzrezeptor, der die Eigenschaft besitzt aus eher harmlosen oder unspezifischen Stimuli, einen Schmerzreiz und die Erregung sensorischer Neurone auszulösen. Die Erregung erfolgt durch Hitze, pH - Veränderungen (Azidose) und wird über eine Bandbreite von molekularen Kaskaden vermittelt. Ein wichtiger Effekt für den Organismus ist die Hyperalgesie der betroffenen Stelle. Im klassischen Virchow'schen Sinne wird hier die Rötung, Wärme, Schmerz, Schwellung und ein Einbüßen der Funktion vermittelt. Im Hinblick auf die nahezu unveränderte Expression stellte sich die Frage, ob es auf den äußerst vielschichtigen Expressionsweg von VR1 (mittels ATP, Proteinkinase C, Phospholipase C und Produkten der Lipooxygenase LO) zu eine Art Herunterregulation des Rezeptors während einer entzündlichen Reaktion im Sinne von actio-reactio kommt?

Eine mögliche Erklärung für die Konstanz der Werte ist wahrscheinlich auf der molekularen Ebene zu suchen. Es ist möglich, dass der VR1 Rezeptor im Laufe der Entzündung modelliert wurde und in seiner Expression auch schwanken könnte. Dies könnte zur Folge gehabt haben, dass die Expression des Rezeptors bei den stärker irritierten Tieren heftiger herunterreguliert wird als bei den schwächer sensibilisierten.

Nach Abschluss der Diskussionskorrektur erschien die Studie von Luo et al, darin berichtete er ebenso über eine wechselnde Expression von VR1 Rezeptoren im Laufe einer Entzündungsreaktion (147). Dies könnte ein weiteres Indiz zur Richtigkeit der oben genannten Hypothese sein.

#### 4.6.3 Endogenes Stickstoffmonoxid (NO)

Das endogene Stickstoffmonoxid NO ist ein Gasmolekül mit Wirkungen auf die Atemwege und das Gefäßsystem. In dieser Studie konnte im Ganglion jugulare - nodosum der Brown Norway Ratte eine Steigerung der neuronalen NO-Synthasen (nNOS) - Expression in den entsprechenden Ganglienzellen auf über 186,2 % des Ausgangswertes beobachtet werden. Dieser starke Anstieg könnte wegen der Wirkung des Stickstoffmonoxids erklärt werden. Das Stickstoffmonoxid, früher als der endothelium-derived Relaxing Factor (EDRF) bezeichnet, ist ein potenter Vasodilatator, was sich besonders in dem pulmonalen Niederdruckkreislauf auswirkt. Darüber hinaus wirkt es relaxierend auf die glatte Muskulatur der Atemwege(65) . In dieser Dissertation wurde postuliert, dass die Stimulation der Tiere mit einem potenten Allergen (Ovalbumin) eine stark entzündliche respiratorische Reaktion ausgelöst habe. Diese konnte anhand der histopathologischen Bilder und dem Verhalten der Tachykinine beobachtet werden. Interessant erschien eine gemeinsame, vergleichende Betrachtung mit einem exzitatorischen Neuropeptid wie der Substanz P. Dabei wurde ein Anstieg der Substanz P von 28 % auf 64 % von einem noch stärkeren Anstieg der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) von 29 % auf 83 % der Ganglienzellen gekennzeichnet. Das legt die Vermutung nahe, dass die Freisetzung von NO eine Art Kontra-reaktion zum Schutz vor der Substanz P folgt und eine protektive bronchodilatatorische Reaktion vermitteln könnte.

Die abschließende Betrachtung der gesammelten Daten dieser Studie führte zu der These einer Hochregulation des Stickstoffmonoxids im atemwegsprotektiven Sinne, um die entzündungsfördernde Reaktion der Substanz P abzuschwächen. Klinische Bestätigung fand diese Hypothese auch in Studien an hohen NO-Spiegel in der Atemluft von Asthmakranken (148, 149, 150).

Die eindeutige Klärung der Rolle des Stickstoffmonoxids bei der entzündlichen Reaktion in den Atemwegen weist allerdings einige Ungereimtheiten auf. So werden auch für das Stickstoffmonoxid negative Einflüsse auf die Atemwege geschildert. Bezogen auf die mukoziliare Clearance soll das NO diese herabsetzen (130). Das endogene NO führt auch zu einem Atemwegsödem und durch die Erhöhung der Plasmaexsudation wird diese Wirkung noch verstärkt. Ferner wurde auch von einer NO-getriggerten pro-inflammatorischen zellulären Immunantwort mit Mastzelldegranulation, Immunglobulin E - Freisetzung sowie einer Eosinophilie berichtet (72,73).

Zusammenfassend konnte eine eindeutige Zuordnung des Stickstoffmonoxids als entzündungsprotektiv oder -fördernd auch in dieser Studie nicht getroffen werden und bleibt weiterhin kontrovers. Eine weitere Entwicklung von NOS-Antagonisten, insbesondere der NOS 2-Inhibitoren ist weiterhin wünschenswert und könnte zur eindeutigeren Klärung der Rolle des Stickstoffmonoxids bei einer schweren respiratorischen Entzündung beitragen.

#### 4.6.4 Neuropeptid Thyrosin NPY

In dieser Studie stieg die Expression von NPY innerhalb der Untersuchungstiere auf über das 2-fache der Ausgangskonzentration an. Dies wird auch durch Studie von Tajli et al bestätigt, die bis zu 75 % der Fasern im SCG positiv für NPY fand (151). Der enorme Anstieg dieser Substanz könnte mit der Funktion von Neuropeptid Y zusammenhängen. Dem Neuropeptid Y wurden neben dem Effekt auf die Atemwege auch weitere u. a. analgetische und konsumptive Wirkungen zugeschrieben. Diese sollen mittels Rezeptoren, unter anderem dem Y2 Rezeptor vermittelt worden sein. Zudem wird von einer eindrucksvollen Wirkung als Vasokonstriktor berichtet (101). Eine Engstellung der Gefäße führte dabei zu einer Abnahme der lokalen Durchblutung in einer von Inflammation betroffenen Region. (101)

NPY wird meist mit Noradrenalin aus dem Nervenverbund freigesetzt und kann auch den Sympathikotonus durch Stimulation der Noradrenalinfreisetzung aus den chromaffinen Zellen der Nebennierenrinde positiv beeinflussen. Der Sympathikus führt nicht nur zu einer Blutdrucksteigerung, sondern auch reaktiv zu einer Bronchodilatation, welche bei einer bronchialen inflammatorischen Reaktion gewiss vorteilhaft ist. Allerdings wurde noch kein gezielter Zusammenhang zwischen NPY und einer Bronchienerweiterung beschrieben.

Sicher erscheint, wie in mehreren laryngologischen Studien bewiesen, dass die nasalen Schleimhäute bei Patienten mit allergischer Rhinitis durchaus von NPY und sein vasokonstriktorisches Wirkungen profitieren. Nach einer Vasokonstriktion am arteriellen Schenkel und einer Senkung der Gefäßpermeabilität schollen die Schleimhäute ab (131) (132) (133).

Im Bezug auf diese Studie könnte es bedeuten, dass das Neuropeptide Y als Reaktion des Organismus auf den starken allergenen Reiz des Ovalbumins (mit konsekutivem Ödem, Inflammation und Bronchokonstriktion) protektiv den Sympathikus über noch ungeklärte Mechanismen aktivierte. Möglich erscheint ein vom Sympathikus vermittelte NPY – Sekretion, die mit Verweis auf die Patienten mit Rhinitis allergica, wahrscheinlich auch auf das bronchiale System eine ödemabschwellende Wirkung haben könnte.

#### 4.6.5. Vasoaktives Intestinal Polypeptid (VIP)

Der Versuch zeigte, dass in den unbehandelten, nativen Tieren nur 1,7 % der Ganglienzellen des Ganglion cervicale Superior (SCG) und Ganglion Stellatum positiv für VIP waren. Die immunhistochemische Auswertung in diesem Versuch zeigte nur einen signifikanten Unterschied in der Expression des VIP bei einem Vergleich der OVA/OVA Tiere mit den nativen Tieren. Nur dort war der Anstieg der Konzentration von 1,7 % bis auf 4,7 % bemerkbar. Bekannt ist, dass die VIP-haltigen Fasern sich netzartig in den Atemwegen verteilen und dabei mit absteigenden Teilungsgrad der Bronchien in ihrem Durchmesser abnehmen. Palmer beschrieb bereits 1986 eine starke bronchodilatatorische Wirkung des VIP (152) . Die Ursachen für die niedrige Expression mögen darin liegen, dass dieses Peptid sehr schnell durch das Enzym Neutrale Endopeptidase (NEP) und von Mastzell- Enzymen vor allem im Rahmen einer Entzündung abgebaut wird (81) . Weitere Studien an asthmatischen Patienten konnten auch eine Abnahme der VIP-hastigen Fasern verzeichnen. Darin wurde auch ein schneller Abbau dieser Substanz durch Mastzellen postuliert. (135).

Es ist demnach durchaus denkbar, dass das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP) mit seinen potenten bronchoprotektiven Wirkungen in den Atemwegen der Versuchsratten deshalb eine so geringe Aktivität in den sympathischen Ganglien und Fasern aufwies. (154) Rückblickend steht demnach der pharmakologischen Wirkungskraft ein möglicher, schneller Abbau in den Atemwegen entgegen. Dies ist momentan ein Ziel der Forschung um haltbare Wirkung mit neuen VIP-haltigen powder Inhalatoren zu erzielen. (156)

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die immunologische Antwort der Brown Norway Ratte auf die Reizung der Atemwege mit dem Hühnereiweiß Ovalbumin untersucht. Das Ausmaß der erzeugten Immunreaktion wurde einerseits mikroskopisch, in Form von histopathologischen Aufnahmen des untersuchten Gewebes und andererseits labortechnisch in der Auswertung des Immunglobulin E Spiegel im Serum erforscht.

Die Ergebnisse wiesen auf eine starke Allergen-Wirkung des Ovalbumins auf die Atemwege der Versuchstiere hin. Dies belegte die Auswertung der histopathologischen Aufnahmen, die eine deutliche Schädigung der Atemwege mit Zeichen einer starken, floriden Entzündung zeigte. Das Ausmaß der Gewebsschädigung war direkt proportional zum Grad der Ovalbumin-provokation. Ebenso ergab die immunologische Auswertung des entnommenen Serums einen signifikant ( $p < 0.0001$ ) starken, über 70-fachen Anstieg der ovalbuminspezifischen Immunglobulin E Konzentration. bei einer maximalen Sensibilisierung und Reizung mit dem Ovalbumin. Aufgrund dieser beiden Beobachtungen wurde eine ausreichende Sensibilisierung und Challenge der Tiere bewiesen. Neben der Induktion und Untersuchung einer Allergen-entzündlichen Reaktion wurden in dieser Arbeit die Ursprünge der sensiblen und sympathischen Innervation der Atemwege der Brown Norway Ratte lokalisiert. Mittels retrograden Tracing mit dem Nervenmarker Fluoro-Gold™ konnten die Perikaryen der sensiblen Fasern in das Ganglion jugulare-nodosum zurückverfolgt werden. Die Ursprünge der postganglionären, sympathischen Fasern in den Atemwegen der Brown Norway Ratten konnten in den Ganglien Superior Cervicale und Ganglion Stellatum lokalisiert werden.

Ein vorrangiger Forschungspunkt dieser Dissertation lag auch in der qualitativen und quantitativen Analyse der Expression der Neuropeptide des non-cholinergen non-adrenergen Nervensystems (NANC) der Brown Norway Ratte. Die Induktion einer schweren Entzündung der Atemwege mit Ovalbumin führte bei den Versuchstieren zu einer Reizung der die Atemwege versorgenden Nervenfasern. Diese Reizung bewirkte eine veränderte Expression der Neuropeptide des NANC. Dabei war der Grad der Allergen-Provokation direkt proportional zum Anstieg der jeweiligen Konzentration der Neuropeptide.

Abschließend wurden die Neuropeptide nach ihrer jeweiligen Zugehörigkeit zum exzitatorischen non-cholinergen non-adrenergen Nervensystem (eNANC) oder inhibitorischen NANC (iNANC) unterteilt. Die quantitative Auswertung der exzitatorischen Neuropeptide wie Substanz P, der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und des Vanilloid-like Rezeptors (VR1) sowie der inhibitorischen Neuropeptide wie des Neuropeptide Thyrosin (NPY) und des Vasointestinal-aktiven Polypeptids (VIP) ergaben klare Expressionstendenzen. Diese ließen sich in einem Reaktionsmuster zusammenfassen. Weitere Beobachtungen aus diesem Experiment ergaben, dass die Neuropeptide Substanz P und das NPY nach der Konfrontation mit dem Ovalbumin einen enormen Expressionsanstieg des über 2fachen des Ausgangswerts aufwiesen. Es konnte aufgezeigt werden, dass diese beiden Substanzen zwei unterschiedlichen Systemen angehören. Die Substanz P, ein bekanntes Tachykinin, gehört eindeutig zu den pro-inflammatorischen eNANC, während NPY aufgrund seiner vasokonstriktorischen Effekte zum Beispiel bei der Rhinitis allergica zum iNANC hinzugerechnet werden kann. Beide Neuropeptide führten weitere Ko-Mediatoren an, sodass bei dieser initiierten Immunantwort sich zwei miteinander konkurrierende Systeme gegenüberstanden. Konkret wurde die Substanz P und der VR1- Rezeptor dem exzitatorischen (entzündungsfördernd) und das NPY mit dem VIP dem inhibitorischen (entzündungshemmend) Systemkreis zugeordnet. Beide Neuropeptidgruppen (exzitatorisches und inhibitorisch) wurden in ihrer antagonistischen Funktion und der Expressionsweise dargestellt. So konnte bei einem Anstieg der Substanz P eine gleich hohe Steigerung der NPY-Freisetzung beobachtet werden. Eine Einordnung des Stickstoffmonoxids (NO) in dieses hypothetische Reaktionsmuster konnte in dieser Studie nicht eindeutig getroffen werden. Es wurde hingewiesen auf die atemwegsprotektiven Wirkungen. Allerdings war aufgrund der zahlreichen in der Literatur angedeuteten entzündungsförderlichen Wirkungen eine eindeutige Zuordnung zum iNANC oder eNANC nicht möglich und bleibt weiterhin kontrovers.

Diese Studie hat die Allergen-Wirkung des Hühnereiweiß Ovalbumin auf die Atemwege der Versuchstiere zeigen können. Die so induzierte Entzündung im respiratorischen System konnte in histopathologischen Bildern und in Immunmarkern verifiziert werden.

Die experimentelle Auswertung des non-cholinergen non-adrenergen Nervensystems (NANC) der Brown Norway Ratte zeigte ein umfassendes und deutliches Reaktionsmuster auf die Entzündung der Atemwege. Die gesammelten Daten sind bedeutsam für das Verständnis und die Beschreibung wichtiger neurobiologischer Vorgänge bei Allergen-induzierten Erkrankungen der Atemwege, wie dem Asthma bronchiale und liefern Anhalt zu weiteren wissenschaftlichen Studien.

## Literaturnachweis

1. Lemanske RF, Jr. , Busse WW.6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111: S502-9
2. From the Centers for Disease Control and Prevention. Self-reported asthma prevalence and control among adults--United States, 2001. *JAMA* 2003;289: 2639-40.
3. Lonjou C, Barnes K, Chen H, Cookson WO, Deichmann KA, Hall IP, A first trial of retrospective collaboration for positional cloning in complex inheritance: assay of the cytokine region on chromosome 5 by the consortium on asthma genetics (COAG). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97: 10942-7.
4. Wilkinson J, Grimley S, Collins A, Thomas NS, Holgate ST, Morton N. Linkage of asthma to markers on chromosome 12 in a sample of 240 families using quantitative phenotype scores. *Genomics* 1998;53: 251-9.
5. Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Begishvili T, Beasley RW, Lampe F, Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153: 1280-4.
6. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344: 350-62.
7. Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 1997;186: 1737-47.
8. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999;17: 255-81.
9. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320: 271-7.

10. Siraganian RP. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol* 2003;15: 639-46.
11. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 1999;104: 985-93.
12. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1988;1: 1129-32.
13. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. The allergen-induced airway hyperresponsiveness in a human-mouse chimera model of asthma is T cell and IL-4 and IL-5 dependent. *J Immunol* 2001;166: 6982-91.
14. Bleecker ER. Cholinergic and neurogenic mechanisms in obstructive airways disease. *Am J Med* 1986;81: 93-102.
15. Barnes PJ. Airway inflammation and autonomic control. *Eur J Respir Dis Suppl* 1986;147: 80-7.
16. Lundberg JM, Lundblad L, Martling CR, Saria A, Stjarne P, Anggard A. Coexistence of multiple peptides and classic transmitters in airway neurons: functional and pathophysiologic aspects. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: S16-22.
17. Lundberg JM, Saria A. Polypeptide-containing neurons in airway smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 1987;49: 557-72.
18. Pack RJ, Richardson PS. The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. *J Anat* 1984;138: 493-502.
19. Laitinen LA, Laitinen A. Innervation of airway smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: S38-42.
20. Laitinen A. Autonomic innervation of the human respiratory tract as revealed by histochemical and ultrastructural methods. *Eur J Respir Dis Suppl* 1985;140: 1-42.

21. Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 1992;49: 715-37.
22. Saria A, Martling CR, Yan Z, Theodorsson-Norheim E, Gamse R, Lundberg JM. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am Rev Respir Dis* 1988;137: 1330-5.
23. Ricco MM, Kummer W, Biglari B, Myers AC, Udem BJ. Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. *J Physiol* 1996;496: 521-30.
24. Stretton D. Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991;18: 675-84.
25. Palmer JB, Barnes PJ. Neuropeptides and airway smooth muscle function. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: S50-4.
26. Palmer JB, Cuss FM, Barnes PJ. VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways. *J Appl Physiol* 1986;61: 1322-8.
27. Lundberg JM, Hokfelt T, Anggard A, Lundblad L, Saria A, Fahrenkrug J,. Neuropeptides with vascular activity: VIP, PHI, NPY and substance P. *Bibl Cardiol* 1984: 60-
28. Fischer A, Folkerts G, Geppetti P, Groneberg DA. Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther* 2002;15: 73-81.
29. Uddman R, Sundler F, Emson P. Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res* 1984;237: 321-7.
30. Silva AP, Cavadas C, Grouzmann E. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta* 2002;326: 3-25.

31. Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106: 713-22.
32. Hwang SW, Oh U. Hot channels in airways: pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2: 235-42.
33. Widdicombe JG. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158: S171-5.
34. Verleden GM. Neural mechanisms and axon reflexes in asthma. Where are we? *Biochem Pharmacol* 1996;51: 1247-57.
35. Barnes PJ. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol* 2001;125: 145-54.
36. Barnes PJ. Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1986;1: 242-5.
37. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br J Pharmacol* 1968;33: 32-41.
38. Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Lou YP, Lundberg JM, Ryrfeldt A, Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction via ruthenium red-sensitive activation of sensory nerves. *Respiration* 1992;59: 272-8.
39. Laitinen LA, Laitinen A. Mucosal inflammation and bronchial hyperreactivity. *Eur Respir J* 1988;1: 488-9.
40. Bannenberg G, Atzori L, Xue J, Auberson S, Kimland M, Ryrfeldt A. Sulfur dioxide and sodium metabisulfite induce bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung via stimulation of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Respiration* 1994;61: 130-7.
41. Widdicombe J. Sensory mechanisms. *Pulm Pharmacol* 1996;9: 383-7.

42. Karlsson JA. The role of capsaicin-sensitive C-fibre afferent nerves in the cough reflex. *Pulm Pharmacol* 1996;9: 315-21.
43. Helke CJ, Hill KM. Immunohistochemical study of neuropeptides in vagal and glossopharyngeal afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1988; 26: 539-51.
44. Harmar AJ, Hyde V, Chapman K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett* 1990; 275: 22-4.
45. Frossard N, Advenier C. Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci* 1991;49: 1941-53.
46. Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 1993;73: 229-308.
47. Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* 1995;45: 1-98.
48. Patacchini R, Maggi CA. Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995;329: 161-84.
49. Wiedermann FJ, Kahler CM, Reinisch N, Wiedermann CJ. Induction of normal human eosinophil migration in vitro by substance P. *Acta Haematol* 1993;89: 213-5.
50. Heaney LG, Cross LJ, Stanford CF, Ennis M. Substance P induces histamine release from human pulmonary mast cells. *Clin Exp Allergy* 1995;25: 179-86.
51. Martling CR, Saria A, Andersson P, Lundberg JM. Capsaicin pretreatment inhibits vagal cholinergic and non-cholinergic control of pulmonary mechanics in the guinea pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984;325: 343-8.
52. Lundberg JM, Saria A. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. *Nature* 1983;302: 251-3.

53. Saria A, Martling CR, Dalsgaard CJ, Lundberg JM. Evidence for substance P-immunoreactive spinal afferents that mediate bronchoconstriction. *Acta Physiol Scand* 1985;125: 407-14.
54. Finney MJ, Karlsson JA, Persson CG. Effects of bronchoconstrictors and bronchodilators on a novel human small airway preparation. *Br J Pharmacol* 1985;85: 29-36.
55. Advenier C, Naline E, Drapeau G, Regoli D. Relative potencies of neurokinins in guinea pig trachea and human bronchus. *Eur J Pharmacol* 1987;139: 133-7.
56. Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB,. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* 1999;19: 529-38.
57. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97: 6155-60.
58. Burgess GM, Mullaney I, McNeill M, Dunn PM, Rang HP. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J Neurosci* 1989; 9: 3314-25.
59. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; 21: 531-43.
60. Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S, McIntyre P. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* 1998;250: 177-80.
61. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389: 816-24.

62. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A,. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342: 1510-3.
63. Breidt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990;347: 768-70.
64. Belvisi MG, Stretton CD, Miura M, Verleden GM, Tadjkarimi S, Yacoub MH,. Inhibitory NANC nerves in human tracheal smooth muscle: a quest for the neurotransmitter. *J Appl Physiol* 1992;73: 2505-10.
65. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327: 524-6.
66. Liu SF, Crawley DE, Evans TW, Barnes PJ. Endothelium-dependent nonadrenergic, noncholinergic neural relaxation in guinea pig pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;260: 541-8.
67. Liu SF, Crawley DE, Evans TW, Barnes PJ. Endogenous nitric oxide modulates adrenergic neural vasoconstriction in guinea-pig pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1991;104: 565-9.
68. Liu SF, Crawley DE, Barnes PJ, Evans TW. Endothelium-derived relaxing factor inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Am Rev Respir Dis* 1991;143: 32-7.
69. Crawley DE, Liu SF, Evans TW, Barnes PJ. Inhibitory role of endothelium-derived relaxing factor in rat and human pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 1990;101: 166-70.
70. Chilian WM, Kuo L, DeFily DV, Jones CJ, Davis MJ. Endothelial regulation of coronary microvascular tone under physiological and pathophysiological conditions. *Eur Heart J* 1993;14: 55-9.
71. Kuo HP, Liu S, Barnes PJ. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* 1992;221: 385-8.

72. Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995;16: 128-30.
73. Ferreira HH, Medeiros MV, Lima CS, Flores CA, Sannomiya P, Autunes E. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur J Pharmacol* 1996;310: 201-7.
74. Narang I, Ersu R, Wilson NM, Bush A. Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax* 2002;57: 586-9.
75. Van Rensen EL, Straathof KC, Veselic-Charvat MA, Zwinderman AH, Bel EH, Sterk PJ. Effect of inhaled steroids on airway hyperresponsiveness, sputum eosinophils, and exhaled nitric oxide levels in patients with asthma. *Thorax* 1999;54: 403-8.
76. Bloom SR, Edwards AV. Vasoactive intestinal peptide in relation to atropine resistant vasodilatation in the submaxillary gland of the cat. *J Physiol* 1980;300: 41-53.
77. Laitinen A, Partanen M, Hervonen A, Pelto-Huikko M, Laitinen LA. VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract. Light and electron microscopic study. *Histochemistry* 1985;82: 313-9.
78. Polla BS, Chung KF, Lundberg JM, Lacroix JS, Dusser D. [Asthma, allergy, current aspects. Tachykinins: clinical and therapeutic implications. Report of the 3A of 22 June 1991]. *Rev Med Suisse Romande* 1991;111: 1055-9.
79. Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Lacroix JS, Pernow J. Release of vasoactive peptides from autonomic and sensory nerves. *Blood Vessels* 1991;28: 27-34.
80. Taton G, Chatelain P, Delhaye M, Camus JC, De Neef P, Waelbroeck M, . Vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide having N-terminal histidine and C-terminal isoleucine amide (PHI) stimulate adenylate cyclase activity in human heart membranes. *Peptides* 1982;3: 897-900.

81. Lilly CM, Bai TR, Shore SA, Hall AE, Drazen JM. Neuropeptide content of lungs from asthmatic and nonasthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151: 548-53.
82. Lilly CM, Kobzik L, Hall AE, Drazen JM. Effects of chronic airway inflammation on the activity and enzymatic inactivation of neuropeptides in guinea pig lungs. *J Clin Invest* 1994;93: 2667-74.
83. Lilly CM, Stamler JS, Gaston B, Meckel C, Loscalzo J, Drazen JM. Modulation of vasoactive intestinal peptide pulmonary relaxation by NO in tracheally superfused guinea pig lungs. *Am J Physiol* 1993;265: L410-5.
84. Ollerenshaw S, Jarvis D, Woolcock A, Sullivan C, Scheibner T. Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma. *N Engl J Med* 1989;320: 1244-8.
85. O'Donnell M, Garippa RJ, Rinaldi N, Selig WM, Tocker JE, Tannu SA, Ro 25-1553: a novel, long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part II: Effect on in vitro and in vivo models of pulmonary anaphylaxis. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270: 1289-94.
86. O'Donnell M, Garippa RJ, Rinaldi N, Selig WM, Simko B, Renzetti L, Ro 25-1553: a novel, long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part I: In vitro and in vivo bronchodilator studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270: 1282-8.
87. Ito Y, Takeda K. Non-adrenergic inhibitory nerves and putative transmitters in the smooth muscle of cat trachea. *J Physiol* 1982;330: 497-511.
88. Palkovits M. Peptidergic neurotransmitters in the endocrine hypothalamus. *Ciba Found Symp* 1992;168: 3-10; discussion 10-5.
89. Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog Neurobiol* 1992;38: 125-67.

90. Gu J, Polak JM, Allen JM, Huang WM, Sheppard MN, Tatemoto K, High concentrations of a novel peptide, neuropeptide Y, in the innervation of mouse and rat heart. *J Histochem Cytochem* 1984;32: 467-72.
91. Sheppard MN, Polak JM, Allen JM, Bloom SR. Neuropeptide tyrosine (NPY) : a newly discovered peptide is present in the mammalian respiratory tract. *Thorax* 1984;39: 326-30.
92. Chan-Palay V, Allen YS, Lang W, Haesler U, Polak JM. Cytology and distribution in normal human cerebral cortex of neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y. *J Comp Neurol* 1985;238: 382-9.
93. Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V Neuropeptide Y (NPY) -like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 1982;116: 477-80.
94. Perney TM, Miller RJ. Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons. *J Biol Chem* 1989;264: 7317-27.
95. Walker MW, Ewald DA, Perney TM, Miller RJ. Neuropeptide Y modulates neurotransmitter release and Ca<sup>2+</sup> currents in rat sensory neurons. *J Neurosci* 1988;8: 2438-46.
96. Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F. Effects of neuropeptides and leptin on nutrient partitioning: dysregulations in obesity. *Annu Rev Med* 2001;52: 339-51.
97. Rohner-Jeanrenaud F. A neuroendocrine reappraisal of the dual-centre hypothesis: its implications for obesity and insulin resistance. *Int J Obes Relat MeTab. Disord* 1995;19: 517-34.
98. Heilig M, McLeod S, Brot M, Heinrichs SC, Menzaghi F, Koob GF, Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology* 1993;8: 357-63.

99. Lundberg JM, Tatemoto K. Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. *Acta Physiol Scand* 1982;116: 393-402.
100. Lundberg JM, Tatemoto K. Vascular effects of the peptides PYY and PHI: comparison with APP and VIP. *Eur J Pharmacol* 1982;83: 143-6.
101. Wahlestedt C, Edvinsson L, Ekblad E, Hakanson R. Neuropeptide Y potentiates noradrenaline-evoked vasoconstriction: mode of action. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;234: 735-41.
102. Baraniuk JN, Silver PB, Kaliner MA, Barnes PJ. Neuropeptide Y is a vasoconstrictor in human nasal mucosa. *J Appl Physiol* 1992;73: 1867-72.
103. Casale TB, Busse WW, Kaliner MA, Said SI, Barnes PJ. Neuropeptides in the pathogenesis of lung inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1988;138: 1053-5.
104. Hamelmann E, Takeda K, Schwarze J, Vella AT, Irvin CG, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21: 480-9.
105. Kudlacz EM, Andresen CJ, Salafia M, Whitney CA, Naclerio B, Changelian PS. Genetic ablation of the src kinase p59fynT exacerbates pulmonary inflammation in an allergic mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24: 469-74.
106. Oshiba A, Hamelmann E, Takeda K, Bradley KL, Loader JE, Larsen GL. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. *J Clin Invest* 1996;97: 1398-408.
107. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115: 257-69.

108. Burrows B, Martinez FD. Bronchial responsiveness, atopy, smoking, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1989;140: 1515-7.
109. Hunter DD, Udem BJ. Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159: 1943-8.
110. Udem BJ, Hunter DD, Liu M, Haak-Frendscho M, Oakragly A, Fischer A. Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118: 150-3.
111. Kang TC, Lee HS, Lee S, Lee CH. Localization and coexistence of calcium-binding proteins and neuropeptides in the vagal ganglia of the goat. *Anat Histol Embryol* 2001;30: 281-8.
112. Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS. Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res* 1998;806: 127-40.
113. Liu X, Andre D, Puizillout JJ. Substance P post-synaptically potentiates glutamate-induced currents in dorsal vagal neurons. *Brain Res* 1998;804: 95-104.
114. Ichikawa H, Helke CJ. Coexistence of s100beta and putative transmitter agents in vagal and glossopharyngeal sensory neurons of the rat. *Brain Res* 1998;800: 312-8.
115. Tajti J, Moller S, Uddman R, Bodi I, Edvinsson L. The human superior cervical ganglion: neuropeptides and peptide receptors. *Neurosci Lett* 1999;263: 121-4.
116. Marx R, El Meskini R, Johns DC, Mains RE. Differences in the ways sympathetic neurons and endocrine cells process, store, and secrete exogenous neuropeptides and peptide-processing enzymes. *J Neurosci* 1999;19: 8300-11.
117. Nieber K, Baumgarten C, Rathsack R, Furkert J, Laake E, Muller S. Effect of azelastine on substance P content in bronchoalveolar and nasal lavage fluids of patients with allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 1993;23: 69-71.

118. Nieber K, Baumgarten CR, Rathsack R, Furkert J, Oehme P, Kunkel G. Substance P and beta-endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90: 646-52.
119. Sann H, Pierau FK. Efferent functions of C-fiber nociceptors. *Z Rheumatol* 1998;57: 8-13.
120. Solway J, Leff AR. Sensory neuropeptides and airway function. *J Appl Physiol* 1991;71: 2077-87.
121. Lambrecht BN, Germonpre PR, Everaert EG, Carro-Muino I, De Veerman M, de Felipe C, Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. *Eur J Immunol* 1999;29: 3815-25.
122. Joos GF, Pauwels RA. The in vivo effect of tachykinins on airway mast cells of the rat. *Am Rev Respir Dis* 1993;148: 922-6.
123. Rennick RE, Loesch A, Burnstock G. Endothelin, vasopressin, and substance P like immunoreactivity in cultured and intact epithelium from rabbit trachea. *Thorax* 1992;47: 1044-9.
124. Van Schoor J, Joos GF, Pauwels RA. Effect of inhaled fluticasone on bronchial responsiveness to neurokinin A in asthma. *Eur Respir J* 2002;19: 997-1002.
125. Woie K, Koller ME, Heyeraas KJ, Reed RK. Neurogenic inflammation in rat trachea is accompanied by increased negativity of interstitial fluid pressure. *Circ Res* 1993;73: 839-45.
126. Koller ME, Woie K, Reed RK. Increased negativity of interstitial fluid pressure in rat trachea after mast cell degranulation. *J Appl Physiol* 1993;74: 2135-9.
127. Bueb JL, Mousli M, Landry Y, Regoli D. Structure-activity studies of bradykinin analogues on rat mast cell histamine release. *Peptides* 1993;14: 685-9.

128. Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Neuropeptide-induced chemotaxis of eosinophils in pulmonary diseases. *Ann Med* 2000;32: 429-39.
129. Dunzendorfer S, Meierhofer C, Wiedermann CJ. Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol* 1998;64: 828-34.
130. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191: 83-8.
131. Lacroix JS, Mosimann BL. Attenuation of allergen-evoked nasal responses by local pretreatment with exogenous neuropeptide Y in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98: 611-6.
132. Hayes JP, Lotvall JO, Baraniuk J, Daniel R, Barnes PJ, Taylor AJ. Bronchoconstriction and airway microvascular leakage in guinea pigs sensitized with trimellitic anhydride. *Am Rev Respir Dis* 1992;146: 1306-10.
133. Knipping S, Holzhausen HJ, Riederer A, Berghaus A. NPY in human nasal mucosa -- an immunocytochemical and immunoelectron microscopical study. *Laryngorhinootologie* 2003;82: 109-13.
134. Ben-Jebria A, Marthan R, Rossetti M, Savineau JP. Effect of passive sensitization on the mechanical activity of human isolated bronchial smooth muscle induced by substance P, neurokinin A and VIP. *Br J Pharmacol* 1993;109: 131-6.
135. Wenzel SE, Fowler AA, 3rd, Schwartz LB. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988;137: 1002-8.

136. Aizawa H, Inoue H, Shigyo M, Takata S, Koto H, Matsumoto K. VIP antagonists enhance excitatory cholinergic neurotransmission in the human airway. *Lung* 1994;172: 159-67.
137. Hakoda H, Xie ZQ, Aizawa H, Inoue H, Hirata M, Ito Y. Effects of immunization against VIP on neurotransmission in cat trachea. *Am J Physiol* 1991;261: L341-8.
138. Expert Panel Report, *J. Allergy. Clin. Immun.* Nov, 2002
139. Strachan, Hygiene Hypothesis, *Thorax* 2000, S 2-S 10
140. Varner, Asthma and rhinitis, Blackwell Science, 2<sup>nd</sup> Edition, London, 2000, 1172-85
141. Trepel, Neuroanatomie, Lippert Anatomie des Menschen, U&S Verlag, 1996 .
142. Lippert, Anatomie des Menschen, U&S Verlag, Auflage 1996
143. Nio DA, Moylan AL , Modulation of T-Lymphocyte function by neuropeptides, *J. Immunology*, 1993, 150, 5281-5288
144. Udem BJ, Dick EC, Inhibition by vasoactive intestinal polypeptide of antigen induced histamine release from guinea pig lung, *Eur. J. Pharmac*, 1983,88, 247-250
145. Griem, Bericht der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Quantitative Unterschiede im Fremdstoffmetabolismus zwischen Versuchstier und Mensch, Dortmund, Berlin, 2002
146. Richardson, Separate neurochemical classes of sympathetic postganglionic neurons project to the left ventricle of the rat heart, [Cell Tissue Res.](#) 2006 Apr;324 (1) :9-16. Epub 2006 Jan 18

147. Luo, Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport*.2004, Mar 22;15 (4) :655-8.
148. M. Ricciardolo, Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System, *Physiol. Rev.*84: 731-765, 2004
149. Barnes, Kharitonov, Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J.* 2003 Mar; 21 (3):433-8.
150. Raskakis, Measurement of Bronchial and Alveolar Nitric Oxide Production Normal and Asthmatic Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Apr 20
151. Tajti, *Neurosci Lett.* 1999 Mar 26; 263 (2-3):121-4
152. Palmer JB, *J Appl Physiol.* 1986 Oct; 61 (4):1322-8.
153. Dey RD, Distribution of vasoactive intestinal peptide- and substance P-containing nerves originating from neurons of airway ganglia in cat bronchi, 1: *J Comp Neurol.* 1991 Feb 8;304 (2) :330-40
154. Groneberg DA, Vasoactive intestinal polypeptide in the respiratory tract: Physiology and pathophysiology *Pneumologie.* 2004 May; 58 (5):330-8.
155. Ohmori, Development of dry powder inhalation system of novel vasoactive Intestinal peptide (VIP) analogue for pulmonary administration. *Life Sci.*2006 Jun 6; 79 (2):138-43. Epub 2006 Feb 3
156. Mannino, Surveillance for Asthma --- United States, 1980—1999, CDC Atlanta, Surveillance Summaries, March 29, 2002 / 51 (SS01) ;1-13

**Danksagung:**

*Ich danke meinen akademischen Lehrern für die Betreuung und die Diskussionen,  
Prof.Dr.med Dr h.c.David Groneberg für die langjährige  
Leitung und Dissertationsbetreuung*

*Prof.Dr.med Alex Fischer für die Schirmherrschaft und die akademische Begleitung  
Dr.med Thai Dinh für die Hilfe an technischen Fragen.*

*All meinen Mitdoktoranden aus dem Allergiezentrum der Berliner Charité  
Und meinen Mitkollegen aus dem Studium der alten Charité, Humboldt Universität zu  
Berlin, Jahrgang 2004 sei ebenfalls gedankt.*

*Besondere Erwähnung gilt auch meinen klinischen Lehrern, den Consultant Physicians  
aus Brighton und London, Großbritannien für die Ausbildung in der internistischen  
Heilkunst.*

## **Erklärung**

„Ich, Thomas Medveczky, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunhistochemische Analyse der Atemwegsinnervation in einem Modell der Allergen-induzierten Atemwegsentzündung.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."