Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

Untersuchungen zur Regulation der seromukösen Drüsen der respiratorischen Nasenschleimhaut des

Menschen



Habilitation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr.med.habil.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Stephan Knipping geboren am 10.03.1965 in Merseburg

Gutachter:

Eröffnungsdatum des Habilitationsverfahrens: 11.03.2003 Datum der Verteidigung: 2.12.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006837 [http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006837]

Referat und bibliographische Beschreibung

Einführung: Die seromukösen Drüsen zählen neben dem Gefäßsystem zu den wesentlichen Bestandteilen der Nasenschleimhaut des Menschen. Sie beteiligen sich an der Befeuchtung der Inspirationsluft und tragen zum Schutz der tieferliegenden Atemwege bei. Im Sekret der Drüsen wurden antivirale und antibakterielle Substanzen gefunden, die im Rahmen von Abwehrmechanismen beteiligt sind.

Ziel: Die physiologischen und pathophysiologischen Prozesse der Nasenschleimhautdrüsen unterliegen einer nervalen Steuerung, die bis heute noch nicht vollständig geklärt wurde. Als regulierende Neurotransmitter scheinen neben den Botenstoffen klassischen. vegetativen auch Neuropeptide und Stickstoffmonoxid beteiligt zu sein. Die hier vorliegenden Untersuchungen sollten einen Beitrag zur Klärung von Regulationsmechanismen und insbesondere des Innervationsmusters der seromukösen Drüsen leisten. Zusätzlich wurde nach morphologischen Veränderungen bei verschiedenen Rhinopathien gesucht. Methoden und Ergebnisse: Von 98 Patienten wurden Proben der unteren Nasenmuschel im Rahmen funktioneller Nasenoperationen entnommen und fixiert. Es folgten histologische, histochemische und immunhistochemische sowie elektronenmikroskopische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen. Für die immunhistochemische Prozedur wurden Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH), Vasointestinales Polypeptid (VIP), Calcitonin gene related peptide (CGRP), Neuropeptid Y (NPY), Substance P (SP) und Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS/ bNOS) verwendet. Zusätzlich wurde eine Acetylcholinesterase -(AChE) und Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-(NADPH-d)- Histochemie durchgeführt. Diaphorase Die Drüsen, die Ausführungsgänge und das periglanduläre Bindegewebe zeigten eine intensive nervale Versorgung. Dabei konnte in Abhängigkeit der verschiedenen Transmitter ein unterschiedliches Verteilungsmuster nachgewiesen werden. In einzelnen Regionen konnten neuroglanduläre Kontaktstellen und fenestrierte Kapillaren gefunden werden.

Schlussfolgerungen: Durch histochemische und immunhistochemische Methoden können periglanduläre Nerven dargestellt werden. Der Nachweis verschiedener Neurotransmitter und Neuropeptide in den periglandulären Neuronen deutet auf eine direkte nervale Regulation der Drüsenfunktionen hin. Zusätzlich kann eine Beeinflussung der Drüsen über eine Wirkung von Stickstoffmonoxid an periglandulären Kapillaren und Nerven angenommen werden. Neben der nervalen Versorgung der Drüsen scheinen auch periglanduläre fenestrierte Kapillaren eine Bedeutung für die Kontrolle der Drüsenfunktionen zu haben.

Knipping, Stephan: Untersuchungen zur Regulation der seromukösen Drüsen der respiratorischen Nasenschleimhaut des Menschen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 147 Seiten, Erscheinungsjahr 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	Seite
2. Einleitung	1
2.1 Aufgaben der respiratorischen Nasenschleimhaut	1
2.2 Morphologie der respiratorischen Nasenschleimhaut	2
2.3 Aufbau der seromukösen Drüsen	4
2.4 Funktion der seromukösen Drüsen	5
2.5 Nervale Versorgung der Nasenschleimhaut	7
2.6 Zielsetzung	8
3. Material und Methoden	11
3.1 Material	11
3.2 Methoden	12
3.2.1 Lichtmikroskopie	12
3.2.1.1 Fixierung und Konservierung	12
3.2.1.1.1 Paraffineinbettung	12
3.2.1.1.2 Gefriertechnik	13
3.2.1.2 Qualitätskontrolle der Präparate	13
3.2.1.3 Histochemische Verfahren	14
3.2.1.3.1 AChE-Nachweis	14
3.2.1.3.2 NADPH-d-Nachweis	15
3.2.1.3.3 NADPH-d/ AChE-Doppelfärbung	15
3.2.1.4 Immunhistochemie	16
3.2.1.4.1 Primärantikörper	17
3.2.1.4.2 Vorbereitung für die Immunhistochemie	21
3.2.1.4.3 ABC-Methode	22
3.2.1.4.4 APAAP-Methode	23
3.2.1.4.5 Konservierung und Auswertung	23
3.2.1.5 Transmissionselektronenmikroskopie	24
3.2.1.5.1 Vorbereitung und Anfertigung der Präparate	24
3.2.1.6 Immunelektronenmikroskopie	24
3.2.1.6.1 Primärantikörper	25

4. Ergebnisse	26
4.1 Zur Morphologie der Nasenschleimhaut	26
4.2 Morphologie der seromukösen Drüsen	29
4.3 Lichtmikroskopische Darstellung der periglandulären Nervenversorgun	g 30
4.3.1 NSE	31
4.3.2 Neurofilament	32
4.3.3 S-100 Protein	32
4.3.4 Cholinerge Innervation	33
4.3.5 Adrenerge Innervation	34
4.3.6 Neuropeptiderge Innervation	35
4.3.6.1 VIP	35
4.3.6.2 CGRP	37
4.3.6.3 SP	38
4.3.6.4 NPY	38
4.3.7 Stickstoffmonoxidnachweis	40
4.3.7.1 NADPH-d	40
4.3.7.2 NADPH-d/ AChE-Doppelfärbung	41
4.3.7.3 Verteilung von nNOS und eNOS	42
4.4 Elektronenmikroskopischer Nachweis der Drüseninnervation	44
4.5 Immunelektronenmikroskopische Befunde	47
4.5.1 NSE und NF	48
4.5.2 Nachweis der Neuropeptide	48
4.5.3 Verteilung von nNOS und eNOS	50
4.6 Morphologische Befunde bei Rhinopathien	52
4.6.1 Zystische Fibrose	52
4.6.2 Allergische Rhinopathie	55
4.6.3 Hyperreaktive Rhinopathie	58
5. Diskussion	60
5.1 Gesamtinnervation der Drüsen	60
5.2 Klassisch-vegetative Innervation	63
5.2.1 Cholinerge Innervation	63

5.2.2 Adrenerge Innervation	64
5.3 Neuropeptiderge Innervation	65
5.3.1 VIP	66
5.3.2 CGRP	68
5.3.3 SP	69
5.3.4 NPY	72
5.4 Einfluss von Stickstoffmonoxid	73
5.5 Einfluss der Gefäßversorgung auf die Drüsen	76
5.6 Morphologische Veränderungen und Neurotransmitterverteilung bei	
verschiedenen Rhinopathien	78
5.6.1 Zystische Fibrose	78
5.6.2 Allergische Rhinopathie	80
5.6.3 Hyperreaktive Rhinopathie	82
5.7 Medikamentöse Therapie von Rhinopathien	84
6. Zusammenfassung	89
7. Literaturverzeichnis	95
8. Anlagen	
9. Thesen	134
10. Danksagung	139
11. Lebenslauf	140

1. Abkürzungen

А	Arterie
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AchE	Azetylcholinesterase
AEC	3-Amino-9-Äthylkarbazol
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische
	Phosphatase
nNOS	neuronale NO-Synthase
bzw.	beziehungsweise
CGRP	Calcitonin gene-related Peptid
ChAT	Cholinazetyltransferase
D	Drüse
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Ig	Immunglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IGSS	Immunogold-Silber-Färbung
LM	Lichtmikroskop
Ν	Nerv
NADPH-d	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-
	Diaphorase
NF	Neurofilament
NK	Neurokinin
NO	Stickstoffmonoxid, Stickoxid
NPY	Neuropeptid Y
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische
Kochsalzlösung	
PNS	Peripheres Nervensystem
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIA	Radioimmunoassay
S-100	S-100 Protein
SP	Substanz P
TBS	Tris-gepufferte physiologische
	Kochsalzlösung
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TH	Tyrosinhydroxylase
V	Vene
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Einleitung

2.1 Aufgaben der respiratorischen Nasenschleimhaut

Die respiratorische Nasenschleimhaut als auskleidende Schicht der Nasenhauptund Nasennebenhöhlen hat im wesentlichen eine Klimatisierungsfunktion, auf die schon Galen (129-199 n.Chr.) hinwies (Malcomson, 1959). Die inspirierte Luft wird dabei durch verschiedene Mechanismen, die durch anatomische Strukturen wie das endonasale Gefäßsystem und die seromukösen Drüsen unterhalten werden, angewärmt und befeuchtet (Änggard, 1974; Mygind, 1978; Grevers, 1987; Albegger, 1988; Bernhardt, 1991; Stjärne, 1991; Mlynski, 2001). Das Schwellgewebe mit seinen unterschiedlichen Füllungszuständen (Körner, 1937; Cauna, 1969; Albegger, 1988; Riederer/ Knipping, 1993) und die fenestrierten Kapillaren (Cauna, 1969; Grevers, 1987; 1988) stellen wichtige vaskuläre Bestandteile für die Regulation der nasalen Sekretion, des nasalen Atemwegswiderstandes und der endonasalen Temperatur dar. Die Steuerung der physiologischen Funktionen des vaskulären Systems unterliegt einer nervalen und endothelialen Kontrolle (Riederer/ Knipping, 1993; 1996). Für die Filtration und Reinigung der Einatmungsluft von Fremdmaterialien und Sekreten werden vor allem das respiratorische Flimmerepithel, das über einen mukoziliaren Transportmechanismus (Deitmer, 1992) verfügt und die sezernierenden, submukösen Drüsen (Cauna, 1969; Ishii, 1970; Grote, 1975) verantwortlich gemacht. Durch den endonasalen Klimatisierungseffekt wird die eingeatmete Luft, die nach der Passage der Nase eine Temperatur zwischen 31-34 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 80-85% aufweist (Bernhardt, 1991; Sano, 1992), für den Eintritt in die tieferen Atemwege vorbereitet. Die Nasenschleimhaut trägt somit zum Schutz der unteren Atemwege bei. Der auf einem alternierenden An- und Abschwellen des Schwellgewebes der Nasenmuscheln beruhende nasale Zyklus, bei dem es für ca. vier bis sechs Stunden zu einer einseitigen Lumeneinengung bzw. -erweiterung kommt, führt zur Regulation der Atemluftmenge und stellt durch Aufrechterhaltung einer konstanten Atemlufttemperatur ebenfalls eine physiologische Funktion der Nasenschleimhaut dar (Albegger, 1988; Widdicombe, 1986). Der nasale Zyklus, der zur Regeneration der Nasenschleimhaut notwendig ist und der Kontrolle durch das vegetative Nervensystem unterliegt, wird subjektiv nicht wahrgenommen, da sich der Gesamtwiderstand der Nasenhaupthöhlen nicht verändert (Widdicombe, 1986). Diese Kontrolle des nasalen Atemwegswiderstandes hat wiederum Auswirkungen auf die optimale Luftzirkulation in den Bronchiolen, die Entfaltung der Alveolen, die Sauerstoffsättigung des Blutes in den Lungenvenen und die Atemfrequenz (Bernhardt, 1991; Sano, 1992; Zhang, 1993). Der Nasenatmungswiderstand und die endonasale Sekretion wird des Weiteren von endokrinen und psychischen Einflüssen sowie von Herzkreislaufparametern und äußeren Temperaturschwankungen beeinflusst (Ohnishi, 1971; Hasegawa, 1978; Riederer, 1996). Es konnten sowohl nasopetale als auch nasofugale Reflexmechanismen nachgewiesen werden (Ohnishi, 1971; Ogura, 1971; Hasegawa, 1978; Zhao, 1994). Im Sekret der Nasenschleimhaut finden sich Immunglobuline verschiedener Subklassen, die neben Zellen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort wie Makrophagen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten für Immunabwehrmechanismen des oberen Atemtraktes zur Verfügung stehen (Brantzaeg, 1967; Baraniuk, 1990; 1991). Epithelial gebildetes, gasförmiges Stickoxid (NO) scheint einen weiteren Beitrag zur nasalen Immunabwehr gegenüber verschiedenen Mikroorganismen zu leisten (Lundberg, 1995). Über die Funktion des auch beim Menschen im Bereich der vorderen Nasenscheidewand nachgewiesenen vomeronasalen oder Jacobson-Organs liegen noch keine endgültigen Erkenntnisse vor (Jahnke, 1998; 2000). Auf Grund der intensiven Nervenversorgung liegt die Vermutung nahe, dass es als Sinnesorgan zur Aufnahme von Pheromonen dient.

2.2 Morphologie der respiratorischen Nasenschleimhaut

Der typische Aufbau der respiratorischen Nasenschleimhaut soll anhand der Anatomie der unteren Nasenmuschel dargelegt werden. Sowohl die mittlere Nasenmuschel als auch die für die Nasenatmung funktionell relevante nasi Intumescentia septi anterior zeigen einen vergleichbaren histomorphologischen Aufbau (Delank, 1993). Das mehrreihige, hochprismatische Flimmerepithel besteht aus zilienlosen bzw. zilientragenden Zylinderzellen, Mikrovilli-besetzten Becherzellen, Intermediärzellen und regenerativen Basalzellen und wird durch eine Basalmembran von der Lamina propria mucosae getrennt (Mygind, 1978; Davis, 1988). Die durchschnittlich 5-8 µm langen und 0,3 µm breiten Zilien weisen ultrastrukturell ein "9+2 -Muster" auf, beruhend auf einem zentralen Mikrotubuluspaar und 9 kreisförmig angeordneten mikrotubulären Dubletten (Adams, 1981; Kuhn, 1988; Deitmer, 1992; Min, 1995; Fang, 1998; Jorissen, 1998; Borkowski, 2000; Knipping, 2002). Unterhalb der Basalmembran finden sich ein subepitheliales Kapillarsystem, die seromukösen Drüsenkomplexe sowie ein ausgedehntes Gefäßnetz (Körner, 1937; Temesrekasi, 1973; Grevers, 1987; Riederer/ Knipping, 1993). Das Gefäßsystem kann in Widerstands-, Austausch- und Kapazitätsgefäße differenziert werden (Änggard, 1974; Malm, 1980; Albegger, 1988). Der Blutfluss wird über die präkapillären Widerstandsgefäße, d.h. Arterien und Arteriolen in ein ausgedehntes subepitheliales und periglanduläres Kapillarnetz geführt (Rosatti, 1954; Änggard, 1977; Baraniuk, 1991). Die Kapillaren weisen ein kontinuierliches, gefenstertes oder diskontinuierliches Endothel auf (Cauna, 1969; Grevers, 1989). Besonders im periglandulären und subepithelialen Bereich zeigen sich endotheliale Fenestrationen, die hier das morphologische Korrelat der Austauschfunktion der Kapillaren darstellen (Cauna, 1969; Zhao, 1994; Grevers, 1997). An den Kapillarplexus schließt sich ein ausgedehntes Venensinussystem, der nasale Schwellkörper, an (Körner, 1937; Rosatti, 1954; Cauna, 1969; Änggard, 1974; Grevers, 1994). Von Kohlrausch (1853) stammen die ersten lichtmikroskopischen Untersuchungen des Schwellgewebes der Nase (Kohlrausch, 1853). Zuckerkandl berichtete 1884 von Schwellkörpern in der unteren und mittleren Nasenmuschel. Schwellkörper gekennzeichnet Der ist durch ausgedehnte, venöse Kapazitätsgefäße, deren Füllungszustand u.a. von sogenannten Drosselvenen oder "cushion veins" bestimmt wird (Cauna, 1969; Grevers, 1987). Die Drosselvenen weisen in das Lumen hineinragende subendotheliale Muskelpolster auf (Grevers, 1987; 1988). Die kavernösen Venen werden von unterschiedlich ausgeprägten Muskelwandungen verstärkt (Körner, 1937; Temesrekasi, 1968). Neben den Drosselvenen scheinen arteriovenöse Anastomosen den Blutfluss in den Kapazitätsgefäßen und damit den Gesamtströmungswiderstand und die endonasale Temperatur zu beeinflussen (Widdicombe, 1986; Baraniuk, 1990; Stjärne, 1991; Riederer, 1996). Andere Autoren bezweifeln die Existenz derartiger Anastomosen in der Nasenschleimhaut (Körner, 1937; Grevers, 1996).

Als weitere Bestandteile der Nasenschleimhaut sind die ortsständigen Zellen des strukturbildenden Systems (Fibrozyten und –blasten), Zellen des immunologischen Systems (Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen), Histiozyten, Granulozyten,

die freien Muskelzellen und die Nervenbündel mit ihren weitverzweigten Nervenfasern, die in die kollagenfaserhaltige Interzellularsubstanz eingebettet sind, zu nennen (Jahnke, 1972; Jafek, 1983; Grevers, 1995). Die von Temesrekasi (1973) und Grevers (1995) nachgewiesenen freien Muskelfasern scheinen durch Verbindung zu den Kapazitätsgefäßen eine Wirkung auf das Blutvolumen zu haben.

2.3 Aufbau der seromukösen Drüsen

Von Schieffendecker (1900) und Schmincke (1903) stammen erste Ausführungen Struktur der Glandulae nasales (Terrahe, 1970). zur Lichtund elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Aufbau der submukösen Drüsen wurden neben den Untersuchungen am Menschen (Terrahe, 1970; Jahnke, 1972; 1974; 1986; Tos, 1977; Knipping, 1995; 2000; 2001; Agha-Mir-Salim, 1998) an folgenden unterschiedlichen Spezies durchgeführt: Koala-Bär (Kratzing, 1984), Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze und Affe (Boysen-Moller, 1964) und Hund (Adams, 1981). Die seromukösen Drüsen entwickeln sich ab der 11. Fetalwoche zunächst nur in den anterioren Abschnitten der Nase und dehnen sich dann in anterior-posteriorer Richtung über die gesamte Nasenschleimhaut aus (Tos, 1975). In der Nasenschleimhaut des Menschen finden sich im subepithelialen Bereich unterhalb einer Kapillarschicht ausgedehnte Komplexe seromuköser Drüsen. Die sowohl tubulär als auch alveolär auftretenden Glandulae nasales setzen sich aus sekretbildenden serösen bzw. mukösen Drüsenendstücken, dem Drüsenausführungsgangsystem und dem periglandulären Bindegewebe mit den versorgenden Gefäßen und Nerven zusammen. Terrahe (1970) unterteilte die Drüsenzelle in Tubulus- und Endstückzellen mit zahlreichen morphologischen Zwischenstufen. Tos (1977) unterschied zwei Formen der subepithelialen Drüsen. Er differenzierte seromuköse Drüsen mit engen Haupt- und Seitengängen, die von inaktivem, kuboidalen Epithel abstammen, von mukösen Drüsen, die im pathologischen Zustand erweiterte pseudogeschichtete Hauptgänge aufweisen. Die normalen seromukösen Drüsen zeigen an ihren tubulären Seitengängen von einfachem Epithel ausgekleidete Azini. Die Azinuszellen sind von einer bindegewebigen Basalmembran umfasst. Elektronenmikroskopisch lassen sich beim Mensch vereinzelt an den Drüsenendstücken und an den Ausführungsgängen myoepitheliale Zellen finden (Agha-Mir-Salim, 1998).

Im Transmissionselektronenmikroskop stellen sich die serösen Drüsenzellen mit kleinen, homogenen und elektronendichten Granula dar (Rha, 1994; Agha-Mir-Salim, 1998; Jahnke, 1998). Die mukösen Azini sind gekennzeichnet durch einen basalwärts gelegenen, teils verformten Zellkern und große, aufgelockerte und zum Teil konfluierende Granula (Kristic, 1984; Tachibana, 1986; Agha-Mir-Salim, 1998). Im apikalen Azinuszellbereich finden sich die Sekretgranula, während basal der Zellkern und supranukleär Zellorganellen wie der Golgi-Apparat, Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum zu finden sind (Kristic, 1984). Die einzelnen Drüsenzellen sind durch Desmosomen bzw. "tight junctions" miteinander verbunden (Agha-Mir-Salim, 1998; Knipping, 2000). Das Epithel der Ausführungsgänge ist meist zweireihig. Im periglandulären Bindegewebe und periduktal lassen sich oft Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten nachweisen (Raphael, 1989; Baraniuk, 1991; Kamijo, 1993; Agha-Mir-Salim, 1998). In direkter Lagebeziehung zu den Azinuszellen finden sich gefensterte Kapillaren (Cauna, 1969; Grevers, 1989; Zhao, 1994; Knipping, 2000). Die Fenestrationen weisen zur Drüsenzelle, während drüsenabgewandt ein kontinuierliches Endothel vorherrscht.

2.4 Funktion der seromukösen Drüsen

Nach der Produktion von Drüsensekret in den Ribosomen und dem Transport über das endoplasmatische Retikulum zum Golgi-Apparat, wo die Granula "verpackt" werden, erfolgt die Exozytose von Speichervesikeln in das Drüsenlumen (Terrahe, 1998). Über 1970: Agha-Mir-Salim, Ausführungsgänge werden die Drüsenprodukte an die Schleimhautoberfläche transportiert. Die submukösen Drüsen sind an der nasalen Sekretion und somit an der Klimatisierungsfunktion der Nasenschleimhaut beteiligt. Sie produzieren einen wesentlichen Anteil des Nasensekretes, welches auch aus den Produkten der Becherzellen besteht und zum zweischichtigen Sekretfilm der Schleimhaut beiträgt (Cauna, 1972; Terrahe, 1970; Mygind, 2001). Dieser Sekretfilm schützt das Epithel und stellt neben der ziliaren Aktivität die Grundlage des mukoziliaren Transportes dar. Er besteht aus einer dem Epithel aufgelagerten, dünnflüssig-serösen bzw. solartigen Lage und davon durch eine membranartige Grenzschicht getrennten dickflüssig-mukösen bzw. gelartigen Anteil (Deitmer, 1992). Aufgenommene Fremdpartikel können so in Richtung Epipharynx transportiert werden. Die Drüsen sind somit neben der Befeuchtung auch an der Reinigung der respiratorischen Schleimhäute beteiligt. Den Drüsen kommt durch eine zunehmende Belastung der Luft mit Stäuben und Gasen eine wesentliche Bedeutung zu (Deitmer, 1992). Im Nasensekret konnten Produkte der serösen Drüsenzellen wie sekretorisches Immunglobulin A, antimikrobielle Proteine (Lysozym, Laktoferrin), Enzyme, Proteaseninhibitoren sowie Produkte der mukösen Zellen (sulfatierte, saure Glykoproteine) gefunden werden (Tachibana, 1986; Barnes, 1987; Raphael, 1989; 1991, Baraniuk, 1990; 1992; Kaliner, 1992; Mullol, 1992). Die Drüsen mit ihren Sekretionsprodukten leisten einen wesentlichen Beitrag bei der spezifische und unspezifischen Immunabwehr der oberen Atemwege (Raphael, 1989). Darüber hinaus finden sich im Drüsensekret Albumin, Histamin und Elektrolyte (Baraniuk, 1990; Kaliner, 1992; Kamijo, 1993). Basierend auf dem ultrastrukturellen Nachweis von zahlreichen Mitochondrien und Kapillaren periduktal erfolgt vermutlich im Ausführungsgangsystem die Rückresorption von Wasser und Elektrolyten (Lantini, 1990; Agha-Mir-Salim, 1998).

Eine wesentliche Bedeutung kommt den seromukösen Drüsen im Rahmen von Infekten und bei der allergischen Hyperreaktivität zu (Petruson, 1987). Bei der viralen Rhinitis wird die Hypersekretion nach einer initialen Phase durch verstärkte vaskuläre Plasmaextravasation im wesentlichen durch eine gesteigerte Drüsensekretion verursacht (Grevers, 1997). Die Hypersekretion bei der allergischen Rhinopathie wird neben der Transsudation aus den Gefäßen hauptsächlich durch Veränderungen im Bereich der Drüsen verursacht (Tos, 1977). Tos konnte eine Zunahme der Dichte und Anzahl der Drüsen sowie der Sekretionskapazität bei nasaler Allergie feststellen (Tos, 1977). Bei der zystischen Fibrose (CF) zeigen sich zystisch-dilatative Veränderungen, ein Überwiegen muköser Drüsen (Schwachman, 1962) und elektronenmikroskopisch überwiegend aufgelockerte Granula in den übermäßig gefüllten Azinuszellen (Jahnke, 1977). Durch die funktionelle Einschränkung der Drüsenfunktionen, bedingt durch o.g. morphologische Besonderheiten, kann nur ein zähes, muköses Nasensekret bei der CF gebildet werden.

2.5 Nervale Versorgung der Nasenschleimhaut

Die Kontrolle der vielfältigen physiologischen Aufgaben der Nasenschleimhaut unterliegt neben endokrinen (Geschlechtshormone, Adrenalin, Thyroxin) und parakrinen (Histamin) Einflüssen komplexen nervalen Regulationsmechanismen. Bisher wurde von einer vorrangigen Kontrolle der Nasenschleimhaut durch das vegetative Nervensystem ausgegangen. In den letzten Jahren konnte auch der Einfluss verschiedener Neuropeptide und von Stickstoffmonoxid auf die Funktionen der Nasenschleimhaut nachgewiesen werden.

In der respiratorischen Nasenschleimhaut wurden insbesondere im Bereich von Gefäßen Nerven mit Neurotransmittern des sympathischen, parasympathischen und sensorischen Nervensystems gefunden. Temesrekasi stellte erstmals mittels einer Silberimprägnationsmethode Nervenfasern an den Gefäßen der menschlichen Nasenschleimhaut lichtmikroskopisch dar (Temesrekasi, 1973).

Elektronenmikroskopische Befunde zur Differenzierung zwischen parasympathischen und sympathischen Nerven an den Gefäßen wurden von Cauna bereits 1970 veröffentlicht (Cauna, 1970). Durch Anwendung histochemischer Verfahren konnten von Ishii und Nomura cholinerge Nervenfasern in der Nasenschleimhaut identifiziert werden (Ishii, 1970; 1972; Nomura, 1972). Mittels Immunfluoreszenztechniken konnten von Dahlström (Dahlström, 1965) und Änggard (Änggard, 1974) bei Säugetieren und von Nomura (Nomura, 1972) am Menschen Nerven des sympathischen Nervensystems nachgewiesen werden. Die Beschreibung dieser Befunde ist jedoch, bedingt durch veraltete Methoden (Dahlström, 1965; Temesrekasi, 1973) und eingeschränkte technische Möglichkeiten (Cauna, 1972) zum Teil unvollständig oder bezieht sich nur auf Teilaspekte des gesamten Innervationsmusters.

Der Ursprung der sympathischen Innervation befindet sich im Seitenhorn des ersten bis fünften Thorakalsegments. Nach der Umschaltung im Ganglion cervicale superius verlaufen die postganglionären Nervenfasern als Plexus caroticus internus bis zur Bildung des Nervus petrosus profundus. Im Canalis pterygoideus wird der N. canalis pterygoidei (N.vidianus) gebildet, der sich mit den parasympathischen Fasern des N. petrosus major vereinigt. Die sympathischen postganglionären Fasern durchziehen ohne Umschaltung das Ganglion pterygopalatinum und versorgen die Nasenschleimhaut als Nervi nasales

14

posteriores und Rami nasales posteriores inferiores der Nervi palatini (Änggard, 1974; Wolf, 1987; Albegger, 1988; Klaassen, 1988; Hauser-Kronberger, 1994).

Die parasympathischen Nerven haben ihren Ursprung im Nucleus salivatorius superior des Hirnstammes und verlaufen als Pars intermedia nervi facialis bis zum äußeren Knie des N. facialis. Der dort entspringende N. petrosus major bildet mit den sympathischen Nervenfasern gemeinsam den N. vidianus. Im Ganglion pterygopalatinum erfolgt die Umschaltung auf die postganglionären Neurone, die mit den sympathischen Fasern zu den Erfolgsorganen der Nasenschleimhaut ziehen (Baraniuk, 1992; Klaassen, 1988). Nach Klaassen gibt es auch Mikroganglien in der Tiefe der Lamina propria mucosae, in denen die postganglionäre Umschaltung erfolgt (Klaassen, 1988). Des Weiteren existieren perivaskuläre cholinerge Nervenfasern der A. sphenopalatina und A. ethmoidales, die dem Plexus caroticus entstammen und somit die Nasenschleimhaut erreichen (Ishii, 1972; Änggard, 1977; Wolf, 1987).

Sensorische Nervenfasern mit Kontakt zu Chemo- und Mechanorezeptoren werden über Axonreflexe in Form einer antidromen Erregung direkt an die Erfolgsorgane geleitet oder verlaufen in den Nervi pterygopalatini des N. maxillaris zu den sensiblen Wurzelzellen des Ganglion trigeminale Gasseri. Die sensiblen Fasern der orthodromen Erregungsleitung enden als Radix sensoria des Trigeminusstammes in den Nuclei terminationis (Wolf, 1987; 1988; Hauser-Kronberger, 1993). Zur Übersichtsdarstellung der nervalen Versorgung siehe *Schema 1 (Anhang)*.

2.6 Zielsetzung

Zur Regulation der vielseitigen Aufgaben der respiratorischen Nasenschleimhaut ist eine nervale Steuerung notwendig. In den bisher vorliegenden Studien wurde der Erforschung der Innervation des nasalen Gefäßsystems besondere Bedeutung beigemessen. Darüber hinaus liegen meistens Untersuchungen an der Nasenschleimhaut verschiedener Tierarten vor, die auf Grund der Speziesunterschiede nicht einfach auf die Bedingungen in der menschlichen Nasenschleimhaut zu übertragen sind. So konnte Stjärne (1991) beim Schwein sowie Norlander (1997) und Finger (1990) bei der Ratte regelmäßig intraepitheliale Nervenfasern finden. die sich in der menschlichen Nasenschleimhaut nicht finden lassen. Darüber hinaus wurden Nervenfasern direkt an Myoepithelzellen beschrieben (Cauna, 1970; Rha, 1994; Tanaka, 1995; Shibano, 1998). Auch die Mengenangaben zum Auftreten der verschiedenen Neuropeptide differieren zwischen Tier und Mensch. In der Nasenschleimhaut des Schweins fand Stjärne (1991) eine 3,5 fach höhere CGRP-Konzentration als im Menschen. Diese Speziesunterschiede im Innervationsmuster und der Transmittermenge machen Versuche an der Nasenschleimhaut des Menschen notwendig.

Obwohl schon Untersuchungen zur Verteilung von Neurotransmittern im Bereich der seromukösen Drüsen der menschlichen Nasenschleimhaut vorliegen, konnten noch nicht alle Fragen zur Regulation der Drüsenfunktionen geklärt werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war

1. die Darstellung der Gesamtinnervation, d.h. der Nachweis nervaler Strukturen in der Umgebung der seromukösen Drüsen mittels histochemischer, immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Techniken;

2. der Nachweis von Neurotransmittern des sympathischen, parasympathischen und sensorischen Nervensystems in den periglandulären Nerven;

3. die Klärung der Frage, ob die Neuropeptide CGRP, VIP, NPY und SP in den periglandulären Nerven zu finden sind;

4. die Suche nach NO-haltigen Nervenfasern an den Drüsen bzw. vasoaktivem endothelialen NO in periglandulären Gefäßen;

5. die immunelektronenmikroskopische Markierung und Lokalisierung neuropeptiderger und nitrerger Nervenfasern im Bereich der Drüsen und damit die Bestätigung bzw. Kontrolle der immunhistochemischen Befunde;

6. der Nachweis der genauen Lokalisation der Nervenfasern im Bereich der Drüsen auf ultrastruktureller Ebene;

7. die Suche nach direkten neuroglandulären Kontaktpunkten bzw. Synapsen;

8. zur Beantwortung der Frage, auf welchem Weg die Neurotransmitter zum Erfolgsorgan Drüse gelangen, beizutragen;

9. die Abklärung weiterer möglicher Regulationsmechanismen an den Drüsen, z.B. einer Beeinflussung der Drüsen durch umliegende Gefäße, zu diskutieren;

10. die Suche nach regulierenden Strukturen im Bereich der Drüsenausführungsgänge;

11. anhand der vorliegenden morphologischen Befunde auf mögliche Regulationsmechanismen an den seromukösen Drüsen einzugehen;

16

12. die Darstellung pathologischer Veränderungen der Drüsen bei ausgewählten, häufig auftretenden Rhinopathien und die Beteiligung neuronaler Mechanismen aufzuzeigen;

13. nach Korrelation der morphologischen Befunde mit den bekannten Wirkungen der Neurotransmitter die Voraussetzungen für die Entwicklung von neuen Rhinologika zu schaffen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Zur repräsentativen Untersuchung der respiratorischen Nasenschleimhaut des Menschen eignen sich Gewebeproben der unteren Nasenmuschel. Hierzu wurden ca. 5x5mm messende Gewebeblöcke 1cm hinter dem Kopf der unteren Nasenmuschel entnommen (Abb.1a,1b). Die unteren Nasenmuscheln konnten im Rahmen von routinemäßig durchgeführten, funktionellen Nasenoperationen wie Conchotomien bzw. Mukotomien und bei traumatologischen Eingriffen (Versorgung von Nasengerüstfrakturen) ohne zusätzliche Beeinträchtigung für die Patienten gewonnen werden. Das bei der Conchotomie regelmäßig anfallende Gewebe der unteren Nasenmuscheln wird im Allgemeinen postoperativ verworfen und keiner weiteren pathohistologischen Begutachtung unterzogen. Die Verwendung der bei den o.g. Eingriffen anfallenden Gewebeproben wurde durch die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Wegen der klinischen Anwendbarkeit der Ergebnisse dieser Studie und der morphologischen Unterschiede in der Makro- und Mikroanatomie der Nase erfolgten die Untersuchungen an Proben der Nasenschleimhaut des Menschen und nicht an Proben anderer Spezies.

Anschließend erfolgte die Entfernung von Knochenlamellen des Os turbinale und für die TEM die Präparation von ca.1,5 x 1,5mm messenden Gewebestücken. Insgesamt wurden Proben von 98 Patienten lichtmikroskopisch und von 45 Patienten elektronenmikroskopisch untersucht. Bei den 98 Patienten handelte es sich um 56 männliche (Altersdurchschnitt 37,7 Jahre) und 42 weibliche Patienten (Altersdurchschnitt 34,7 Jahre) im Alter von 16 bis 75 Jahren (Altersdurchschnitt gesamt: 36,4 Jahre). Von 45 Patienten (28 Männer und 17 Frauen, Alter: 16 bis 72 Altersdurchschnitt 37,3 Jahre) wurden Proben Jahre. der elektronenmikroskopischen bzw. immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen zugeführt.

Des Weiteren erfolgten licht-, elektronenmikroskopische und immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen an Proben der unteren Nasenmuschel von folgenden Patientengruppen: 11 Patienten mit cystischer Fibrose, davon 4 weibliche und 7 männliche Patienten (Altersverteilung: 3. bis 17. Lebensjahr, Altersdurchschnitt 8,3 Jahre), 25 Patienten mit perennialer allergischer Rhinitis (14 Männer, 11 Frauen, Alter: 16 bis 70 Jahre, Altersdurchschnitt 37,6 Jahre) und 7 Patienten mit vasomotorischer Rhinopathie (3 Männer, 4 Frauen, Alter: 17 bis 39, Altersdurchschnitt: 27,4 Jahre).





Abb.1b: Präparierter Gewebeblock der unteren Nasenmuschel vor der Fixation.

3.2 Methoden

3.2.1 Lichtmikroskopie

Die Proben der unteren Nasenmuschel wurden zunächst lichtmikroskopisch untersucht. Hierbei sollten der reguläre Aufbau der unteren Nasenmuschel und insbesondere die Anordnung und Morphologie der Drüsen beurteilt werden. Zur Markierung nervaler Stukturen wurden histochemische und immunhistochemische Techniken angeschlossen.

3.2.1.1 Fixierung und Konservierung

3.2.1.1.1 Paraffineinbettung

Die Gewebeproben der unteren Nasenmuscheln kamen direkt nach der Entnahme in ein Fixiermedium. Dafür eignete sich frisch hergestelltes 4% gepuffertes Paraformaldehyd oder 3,5% gepuffertes Formalin (pH 7,4). Die Präparate wurden für 12 bis 24 Stunden bei Kühlschranktemperatur (4 Grad Celsius) fixiert. Auf Grund des möglichen Verlustes von Antigenbindungsstellen kam das anfangs ebenfalls verwendete Bouinsche Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch bei weiteren Versuchen nicht mehr zum Einsatz.

Nach Auswaschung des Fixans in Leitungswasser kamen die Präparate zur Entwässerung in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 95%, 100% Ethanol für je

2x5 Minuten) und nach dem Xylolbad zur Einbettung in Paraffin. Aus den Paraffinblöcken wurden am Schlittenmikrotom (Biocut, Firma Reichert-Jung, Heidelberg) 1 bis 3µm messende Serienschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Abschließend erfolgte die Trocknung der Schnitte bei 56 Grad Celsius im Brutschrank.

Die Paraffineinbettung erwies sich als weniger schonendes Verfahren, da bei Erwärmung der Präparate bis auf ca. 60 C^0 und der Trocknungsprozedur Proteinstrukturen bzw. Antigendeterminanten durch inter- und intramolekulare Vernetzungen verändert werden können. Allerdings konnte besonders bei der Paraffineinbettung eine gute Gewebekonservierung erreicht werden. Je nach verwendetem Primärantikörper erwies sich die Paraffinmethode oder die Gefriertechnik für die Immunhistochemie als geeignet.

3.2.1.1.2 Gefriertechnik

Die Gewebeproben wurden im Vorfixierungsverfahren nach einer 2 stündigen Fixation in 4% gepuffertem Paraformaldehyd einer 24 stündigen Inkubation in einer kryoprotektiven Lösung (Saccarose 10-20%) bei Kühlschranktemperatur unterzogen. Beim Nachfixierungsverfahren erfolgte nach einem 2 minütigen Methylbutanbad die Plazierung des Gewebes mittels Tissue-Tek Einbettmedium (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) in einem Plastikschälchen. Anschließend Präparate vorsichtig schrittweise in flüssigem Stickstoff wurden die schockgefroren, in Aluminiumfolie verpackt und bei -20 C⁰ konserviert. Am Kryostat (2800 Frigocut N, Reichert-Jung, Heidelberg) konnten Gefrierschnitte von 5 bis 14µm Schichtdicke angefertigt und auf Super Frost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgezogen werden. Beim Nachfixierungsverfahren wurde Aceton oder 4% gepuffertes Paraformaldehyd für 10 Minuten verwendet. Der Vorteil der Gefriertechnik liegt in der sehr guten Antigenerhaltung im Gewebe. Somit können gerade Substanzen, die in sehr geringen Konzentrationen

vorliegen (Neuropeptide bzw. Enzyme), ausreichend nachgewiesen werden.

3.2.1.2 Qualitätskontrolle der Präparate

Zum Ausschluss pathologisch veränderter Präparate, d.h. durch massive Infiltration mit Entzündungszellen veränderter Schleimhäute, erfolgte eine histologische Begutachtung der zu untersuchenden Nasenmuscheln. Dazu wurden die Gewebeproben mit Haematoxylin-Eosin (HE), Mayers saurem Hämalaun oder Toluidinblau O gefärbt, geeignete Gewebeschnitte selektiert und unbrauchbare Proben von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Zusätzlich erfolgten Azanund van Gieson- Färbungen der Präparate. Die Voruntersuchung mit Hilfe routinemäßig angewendeter Färbemethoden sollte auch der Darstellung des histologischen Grundaufbaues der unteren Nasenmuschel dienen. Durch den Kontakt der Nasenschleimhaut mit verschiedenen Umweltnoxen, Gasen, Stäuben, Aerosolen, Allergenen und Medikamenten (z.B. α -Sympathomimetika) sowie abgelaufene Entzündungen kann keine reizfreie bzw. normale Nasenschleimhaut vorgefunden werden (Jahnke, 1972). Morphologisch spiegelt sich dieser Sachverhalt u. a. in der Akkumulation von Lymphozyten im subepithelialen Bindegewebe wieder.

3.2.1.3 Histochemische Verfahren

Durch histochemische Techniken können endogene Enzyme im Gewebe nachgewiesen werden. Bei Zugabe eines geeigneten Substrates kommt es nach Reaktion mit dem Enzym zur Ausfällung des Reaktionsproduktes, welches sichtbar gemacht werden kann. Zur Erhaltung der nachzuweisenden Substanzen eignen sich besonders Gefrierschnitte (Leonhardt, 1990).

3.2.1.3.1 Azetylcholinesterase (AChE)- Nachweis

Zum Nachweis der den postganglionären parasympathischen Transmitter Azetylcholin hydrolisierenden Azetylcholinesterase wurde die Versuchsanordnung von Karnovsky und Roots (Karnovsky, 1964) in modifizierter Form angewendet. Gefrierschnitte kamen nach einer Auftauphase in Natriumazetat für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Inkubation in ein Medium (pH 5,5) bestehend aus 5mg Azetylthiocholin, 6,5ml Natriumazetat (0,1 molare Lösung, pH 6,0), 0,5ml Natriumzitratlösung (0,1 molar), 1,0 ml Kupfersulfat (0,03 molar), 1,0ml Kaliumhexazyanoferrat (0,005 molar) und 1,0 ml H₂O. Es folgten Waschvorgänge mit 0,1 molarem Natriumazetat (5x1 Minute), 1%igem Ammoniumsulfid (1 Minute), 0,1 molarem Natriumnitrat (5x1 Minute). Das positive, braungefärbte Reaktionsprodukt entsteht durch einen Niederschlag von Kupferferrizyanid und markiert die Lokalisation der Azetylcholinesterase im Gewebe. Zusätzlich erfolgten Reaktionskontrollen durch selektive Blockierung der Cholinesterasen mit Physiostigmin (0,01 mM) zum Nachweis falsch-positiver Färbungen durch unspezifische Esterasen.

3.2.1.3.2 Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-Diaphorase (NADPH-d)- Nachweis

Basierend auf der 1964 von Thomas und Pearse angegebenen histochemischen Technik zum Nachweis des Enzyms NADPH-d wurde in dieser Studie eine von Neuhuber und Wörl modifizierte Methode nach Vincent und Kimura (Vincent, 1992) angewendet. Der Nachweis dieses Enzymkomplexes kann indirekt mit der Stickstoffmonoxid (NO)- Synthese korreliert werden. Da alle NO-Synthasen eine NADPH-d- Aktivität zeigen, kann von einer Kolokalisation beider Enzymsysteme ausgegangen werden (Riederer, 1996; Heß, 2000). Somit können mit dieser Methode alle NOS-Isoformen dargestellt werden. Selten gibt es auch NADPH-Diaphorasen ohne NOS (Heß, 2000).

Die farbliche Markierung der Enzymaktivität entsteht durch Umsetzung des Farbstoffes Nitrobluetetrazolium (NBT) durch die NADPH-Diaphorase zu einem blauen Reaktionsprodukt. Die Gefrierschnitte wurden nach dem Auftauen in einer Lösung aus 0,3% igem Triton X-100, 0,1mg/ml Nitrobluetetrazoliumund 1,0mg/ml β -NADPH in 0,1 molarem Phosphatpuffer (PBS) für 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Negativkontrolle erfolgte durch Weglassen von β -NADPH und zeigte keine Färbereaktion.

3.2.1.3.3 NADPH-d/ AChE-Doppelfärbung

Für den Nachweis der cholinerg-nitrergen Koinnervation wurde nach den Schritten der oben beschriebenen Technik zur Darstellung der NADPH-Diaphorase die histochemische Markierung der Azetylcholinesterase nach Karnovsky und Roots angeschlossen. Nach mehreren Spülungen der Präparate in PBS (3x10 Minuten) folgte die Inkubation in einer Lösung aus 0,5mg/ml Azetylthiocholinjodid, Natrium-Citrat-2-Hydrat, 29,4mg/ml 4.8 mg/mlKupfersulfat (wasserfrei), 1,65 mg/mlKaliumferrizyanit und 0.342mg/ml **Iso-OMPA** (Tetraisopropylpyrophosphoramid) in 0.1 molarem Natriumhydrogen-Maleatpuffer (pH 6,0) für 40 Minuten. Durch Einbringen der Präparate in PBS

wurde die Reaktion abgebrochen. Braun gefärbte Gewebebezirke repräsentieren cholinerge Strukturen, blau gefärbte Fasern enthalten NADPH-d.

3.2.1.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren haben seit der Verwendung von Antikörpern fluoreszenzfarbstoffgekoppelten durch Coons (1941)eine zunehmende erlangt heute Bedeutung und gehören bei zahlreichen pathohistologischen Fragestellungen zum Standard. Im Gewebe vorhandene antigene Determinanten (Ag) können mit spezifischen Primärantikörpern (Ak), die wiederum mit Enzymen (Meerrettichperoxidase, alkalische Phophatase) oder partikulären Substanzen (z.B. kolloidales Gold) gekoppelten Sekundärantikörper reagieren, identifiziert werden. Die dabei entstehenden Ag-Ak-Komplexe können lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Dabei werden Chromogene, die von entsprechenden Enzymen katalysiert werden, oder Fluoreszenzfarbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Diese sehr empfindliche Technik wird maßgeblich von verschiedenen Faktoren wie der Spezifität der Antikörper, einer sorgsamen Gewebebehandlung und damit Erhaltung des gesamten Gewebes mit den antigenen Strukturen, einer fachgerechten Aufbewahrung sowie Anwendung der Reagenzien und der Einhaltung strenger Zeit- und Temperaturbestimmungen beeinflusst. Zur Anwendung kommen polyklonale und monoklonale Ak verschiedener Spezies. Polyklonale Antikörper, die von verschiedenen Plasmazelllinien stammen, reagieren auf Grund ihrer Heterogenität mit verschiedenen Epitopen. Sie besitzen unterschiedliche Affinität und können zu falsch-positiven Immunreaktionen führen. Der Nachweis von antigenen Determinanten im, zum Teil durch die Fixierung beeinträchtigten, Gewebe gelingt jedoch mit größerer Verlässlichkeit. Dadurch kann die Reaktionsfähigkeit der Methode erweitert werden. Die aus einem Plasmazellklon stammenden monoklonalen Antikörper sind nur gegen eine antigene Determinante gerichtet und besitzen dadurch eine höhere Spezifität. Bei fixierungsbedingter Zerstörung des vom Ak angesteuerten spezifischen Epitopes ergeben sich Markierungsprobleme und eine eingeschränkte Reaktionsfähigkeit.

3.2.1.4.1 Primärantikörper

Die Paraffin- und Gefrierschnitte wurden mit verschiedenen monoklonalen und polyklonalen Primärantikörpern, deren optimale Konzentrationen in Verdünnungsreihen bestimmt wurden, in einer feuchten Kammer inkubiert. Ebenso erfolgten verschiedene Versuchsreihen zur Festlegung optimaler Temperaturbedingungen und des Detektionssystems.

Zur Darstellung von Nervenstrukturen in der Nasenschleimhaut kamen Antikörper gegen das S-100 Protein (Marker der periaxonalen Schwannzellen und periganglionären Gliazellen), gegen die neuronenspezifische Enolase (Enzym in peripheren Neuronen) und gegen Neurofilamente (Zytoskelettproteine der peripheren Neurone) zum Einsatz. Der immunhistochemische Nachweis sympathischer Nervenfasern wurde mit Antikörpern gegen die Tyrosinhydoxylase (Enzym der Noradrenalinsynthese) und der parasympathischer Nerven mit Antikörpern gegen die Cholinazetyltransferase (Enzym der Azetylcholinsynthese) durchgeführt. Die folgenden Neuropeptide wurde in der Nasenschleimhaut lokalisiert: vasointestinales Polypeptid (VIP), Calcitonin gene related Peptid (CGRP), Substanz P (SP) und Neuropeptid Y (NPY). Stickstoffmonoxid (NO) wurde in Nerven mittels Antikörpern gegen die neuronale (brain) NO-Synthase dargestellt. Zum Nachweis des endothelialen Vorkommens von NO kamen Antikörper gegen eNOS zum Einsatz.

Bei jeder Versuchsreihe wurden Substitutionskontrollen als Negativkontrollen mitgeführt. Hierbei konnten fehlerhafte, d.h. unspezifische Immunreaktionen in Form von Hintergrundfärbungen erkannt und die entsprechenden Ergebnisse der Versuchsreihe als negativ gewertet werden. Bei den Negativkontrollen kamen die Präparate nicht mit dem spezifischen Antikörper, sondern mit Pufferlösungen (PBS oder TBS) zur Inkubation. Bei regelrechtem Versuchsablauf konnten hierbei keine Immunfärbungen festgestellt werden.

Im Rahmen der Vorbereitung für die immunhistochemischen Versuche wurden auch Positivkontrollen an Geweben durchgeführt, die das Antigen ebenfalls enthalten. Dazu kamen Präparate des menschlichen Dünndarms mit den Antikörpern zur Inkubation. Es konnten positive Immunreaktionen im Plexus submucosus Meissner und im Plexus myentericus Auerbach festgestellt werden. Außerdem wurden Kontrollen an Schnitten vom Rückenmark der Ratte als positiv getestet. In der nachfolgenden Tabelle sind die einzelnen Antikörper, Hersteller mit Ortsangabe, die optimalen Verdünnungen, Inkubationszeiten (in Stunden), Inkubationstemperaturen (RT-Raumtemperatur von ca. +20 C⁰; KT-Kühlschranktemperatur von ca. +4 C⁰) und die jeweils verwendete Detektionsmethode aufgeführt.

Tabelle 1 mit den verwendeten Antikörpern

ANTI- KÖRPER	HER- STELLER	VER- DÜNNUNG	INKU- BATIONS-	INKU- BATIONS-	DETEK- TIONS-
			ZEITEN (h)	TEMPE- RATUR	METHODE
S-100 Protein					
polyklonal	DAKO; Hamburg	1 : 200	2	RT	ABC, APAAP
NSE					
monoklonal	DAKO; Hamburg	1 : 200	48	KT	ABC, APAAP
polyklonal	DAKO; Hamburg	1 : 200	1	RT	ABC
Neuro- filament					
monoklonal	DAKO; Hamburg	1 : 100	1	RT	ABC
Tyrosinhy- droxylase					
monoklonal	Boehringer; Mannheim	1 : 100 (1 : 200)	24 (2)	KT (RT)	ABC, APAAP
Cholin- azetyl- transferase					
polyklonal	Mäder; Göttingen	1 : 100	24	KT	ABC
VIP					
monoklonal	Dianova; Hamburg	1:100	48	КТ	APAAP
polyklonal	Peninsula; Belmont, USA	1 : 200 (1 : 1000)	2	RT	ABC
polyklonal	Affiniti; Exeter, UK	1 : 800	0,5 (18)	RT (KT)	ABC
polyklonal	Biotrend, Köln	1 : 800	2	RT	ABC
polyklonal	Chemicon, Temecula, USA	1 : 500	12	RT	ABC

ANTI- KÖRPER	HER- STELLER	VER- DÜNNUNG	INKU- BATIONS-	INKU- BATIONS-	DETEK- TIONS-
NOT LIK		Denterio	ZEITEN (h)	TEMPE- RATUR	METHODE
CGRP					
polyklonal	Peninsula; Belmont, USA	1 : 750	2	RT	ABC
polyklonal	Unger; München	1 : 750	2	RT	ABC
polyklonal	Milab; Schweden	1 : 1200	48	KT	ABC
polyklonal	Serotec; Oxford, UK	1 : 500	2	RT	ABC
polyklonal	Biotrend, Köln	1 : 1000	4	RT	ABC
VIP-Rez					
monoklonal	Dianova; Hamburg	1:100	2,5	RT	APAAP
SP					
polyklonal	Affiniti; Exeter, UK	1 : 1000	1 (18)	RT (KT)	ABC
polyklonal	Serotec; Oxford, UK	1 : 750	2	RT	ABC
NPY					
polyklonal	Peninsula; Belmont, USA	1 : 750	18	КТ	ABC
polyklonal	Chemicon, Temecula, USA	1 : 1000	2	RT	ABC

ANTI- KÖRPER	HER- STELLER	VER- DÜNNUNG	INKU- BATIONS- ZEITEN (h)	INKU- BATIONS- TEMPE- RATUR	DETEK- TIONS- METHODE
eNOS					
monoklonal	Transduc- tion Lab.; Lexington, USA	1 : 100	18	KT	ABC
polyklonal	Transduc- tion Lab.; Lexington, USA	1 : 50	18	KT	ABC
bNOS					
polyklonal	Maier; Graz	1:100 (1 : 1500)	1 (18)	RT (KT)	ABC
polyklonal	Transduc- tion Lab.; Lexington, USA	1:75	12	KT	ABC
polyklonal	Alexis, San Diego, USA	1 : 200	2	RT	ABC

3.2.1.4.2 Vorbereitung für die Immunhistochemie

Zur Vorbereitung für die immunhistochemischen Arbeitsschritte mussten die Paraffinschnitte zur Entfernung des Paraffins in Xylol eingebracht und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70% Ethanol) rehydriert werden. Bei formalinfixierten Präparaten war zur Demaskierung verdeckter Determinanten im Gewebe in einigen Versuchen eine proteolytische Andauung mit 0,1%iger Protease (Sigma, Deisenhofen) für 5 Minuten notwendig. Alternativ wurde eine Mikrowellenbehandlung der Präparate in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) für 4 mal 5 Minuten bei 600 Watt durchgeführt. Anschließend schlossen sich je nach Detektionsmethode Waschvorgänge in Pufferlösungen (PBS oder TBS- *siehe nachfolgende Tabelle 2*) an.

TRIS-Puffer-Lösung (TBS) pH 7,5	Phosphatpuffer-Lösung (PBS) pH 7,3–7,6
Zusammensetzung	Zusammensetzung
Tris-Base 4,5g; Tris-HCl 34,25g; NaCl 43,95g in 5 Liter H ₂ O dest.	NaCl 42,5g; Na ₂ HPO ₄ 6,35g; NaH ₂ PO ₄ 1,95g in 5 Liter H ₂ O dest.
АРААР	ABC
IGSS	Immunelektronenmikroskopie

Tabelle 2 mit den verwendeten Pufferlösungen

Die vorher bei -20 C^0 konservierten Gefrierschnitte wurden langsam auf Raumtemperatur gebracht und bis zum Versuchsbeginn in entsprechenden Pufferlösungen gelagert.

Zur Minderung von unspezifischen Bindungsreaktionen der Primärantikörper an freien reaktiven Gewebsantigenen erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten mit einem verdünnten Serum (DAKO, Hamburg; Verdünnung 1:5 bis 1:20) von der Tierspezies stammend, in der der Sekundärantikörper hergestellt wurde.

3.2.1.4.3 Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode

Bei der ABC-Methode reagiert der Primärantikörper mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, an den sich der vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplex bindet. Als Enzym dient die Meerrettichperoxidase, die das Chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) zu einem löslichen roten Farbstoff umsetzen kann (Guesdon, 1979).

Nach den vorbereitenden Schritten erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase (in Erythrozyten, Granulozyten und Muskelzellen vorkommend) mit 3%igem wässrigen oder methanolischem H₂O₂ für 6 Minuten. Nach Spülung in PBS und Aufbringen des Normalserums schloss sich die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (*siehe Tabelle 1*) an. Nach PBS-Waschungen wurden die Präparate mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (VECTOR, Burlingame, USA; Verdünnung 1:200) für 30 Minuten und nach erneuter PBS-Waschung mit dem ABC-Komplex-Reagenz (VECTOR, Vectastain-Elite, Wiesbaden) für 30 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte nach PBS-Waschung das Aufbringen der chromogenen Substratlösung AEC (DAKO, Hamburg) für 5 bis 20 Minuten unter lichtmikroskopischer Kontrolle, bis eine entsprechend hohe Farbintensität erreicht war.

3.2.1.4.4 Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase

(APAAP)-Methode

Es handelt sich um eine Enzym-anti-Enzymkomplex-Technik, bei der ein im Überschuß vorliegender Brückenantikörper zwischen dem Primärantikörper und Zweitantikörper, gegen den das Markerenzym gerichtet ist, bindet (Mason, 1985; Stein, 1985). Als Chromogene werden Fast Red oder Neufuchsin (DAKO, Hamburg) verwendet. Zur Signalverstärkung können wiederholte Inkubationen mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex durchgeführt werden. Dabei können aber auch vermehrt unspezifische Reaktionen auftreten.

Nach TBS-Waschung und Primärantikörper-Inkubation wurde der Brückenantikörper (DAKO, Hamburg; Verdünnung 1:50) für 30 Minuten aufgebracht. Nach TBS-Waschung schloss sich die Reaktion mit dem APAAP-Komplex (DAKO; Verdünnung 1:50) für 30 Minuten an. Wiederholte Waschung in TBS und das Auftragen des Chromogens unter lichtmikroskopischer Kontrolle, bis sich eine rote Markierung der Immunkomplexreaktionen feststellen ließ, beendeten das Verfahren.

3.2.1.4.5 Konservierung und Auswertung

Nach Abschluss der immunhistochemischen Versuche wurden die Präparate mit Leitungswasser und Aquadest gespült und zur sichtbaren Darstellung des umliegenden Gewebes einer Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun (MERCK, Darmstadt) für 1 bis 2 Minuten unterzogen. Eine 15 minütige Spülung in Leitungswasser schloss sich an. Die Konservierung der Präparate erfolgte durch Eindecken in einem wässrigen Medium (Kaisers Glyzerin Gelatine; Merck, München). Die Photodokumentation positiver Immunreaktionen wurde am Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) durchgeführt.

3.2.1.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Aufbauend auf den lichtmikroskopischen Befunden sollte der ultrastrukturelle Aufbau der seromukösen Drüsen untersucht und der Nachweis von periglandulären nervalen Strukturen gesichert werden. Um die im Lichtmikroskop nicht erkennbaren feinstrukturellen Zusammenhänge darzustellen, waren ein hohes Auflösungsvermögen sowie hohe Vergrößerungen, wie sie die Elektronenmikroskopie ermöglicht, notwendig.

3.2.1.5.1 Vorbereitung und Anfertigung der Präparate

Aus dem Conchotomiepräparat wurden ca. 1,5 x 1,5mm messende Gewebeblöcke Die Fixierung zurechtgeschnitten. der Präparate erfolgte in 3% phosphatgepuffertem Glutaraldehyd (Phosphatpuffer nach Schultz-Karlsson) über Nacht im Kühlschrank. Nach Waschung in Phosphatpuffer (nach Schultz-Karlsson) wurde die Nachfixierung in 1% Osmiumsäure für 2 Stunden sowie nach einer erneuten Pufferwaschung die Dehydrierung in einer aufsteigenden Acetonreihe (30%,50%,70%,80%,90%,100% Aceton) und in Propylenoxid durchgeführt. Nach einer Inkubation mit einer Propylenoxid-Durcupan Mischung für 3x1 Stunde und einer Durchdringungsphase in Durcupan bei 45 Grad Celsius für 3x2 Stunden wurden die Präparate im Wärmeschrank bei 65 Grad Celsius für 48 Stunden wärmepolymerisiert und zur Aushärtung gebracht. Nach dem Anfräsen erfolgte das Anfertigen von 0,3µm messenden Semidünnschnitten (Reichert-Jung Ultracut E, Wien) und die Färbung mit Toluidinblau O. Anschließend konnten die Präparate am Lichtmikroskop untersucht und geeignete Regionen für die Elektronenmikroskopie selektiert werden. Die zu untersuchenden Geweberegionen wurden nach einem Zieltrimmen ultradünn geschnitten (Reichert-Jung, Ultracut E, Wien; Schnittdicke 50-70nm) und auf befilmte Trägernetze aufgebracht. Eine Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat beendete die Präparierung. Abschließend konnten die Präparate am Elektronenmikroskop (EM 902 A Zeiss, Jena) ausgewertet und interessante Regionen photodokumentiert werden.

3.2.1.6 Immunelektronenmikroskopie

Die Fixierung der Präparate für die immunelektronenmikroskopischen Versuche erfolgte in einem Gemisch aus 2% iger Paraformaldehyd- und 0,1 %iger Glutaraldehydlösung in PBS für 2 Stunden im Kühlschrank. Nach Spülung in PBS

und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (20%,50%,70%,80%,100% Ethanol) kamen die Präparate bei Kühlschranktemperatur über Nacht in Unicryllösung.

Der Einbettung in Beem - Kapseln folgte die Polymerisierung bei -5 C^0 im UV-Licht.

3.2.1.6.1 Primärantikörper

Die 50nm messenden Ultradünnschnitte wurden auf Nickel-Trägernetze aufgebracht und anschließend auf Parafilmfolie mit PBG-verdünnten Primärantikörpern über Nacht bei Kühlschranktemperatur inkubiert. Vorher erfolgte die Blockierung freier Aldehydgruppen mit einer PBS-Glycin-Lösung und das Auftragen von einer PBG- Lösung, bestehend aus 0,45% iger Fischgelatine (MERCK, Darmstadt), PBS und 0,5 %igem bovinem Serumalbumin (SIGMA, Deisenhofen) für 2 mal 10 Minuten. Die Angaben zu den Antikörpern, Herstellern und Verdünnungen finden sich in *Tabelle 3*.

Nach Waschschritten in PBG folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (VECTOR, Burlingame, USA; Verdünnung 1:200), Spülungen mit PBG und die Inkubation mit dem Streptavidin-Immunogold-Komplex (Auroprobe EM Streptavidin G10, AMERSHAM, Buckingshamshire, UK). Dieser Komplex enthält die, bei der elektronenmikroskopischen Auswertung nachweisbaren, 10nm messenden Goldpartikel (Beesley, 1989). Abschließend wurden die Trägernetze in PBG, PBS und Aqua bidest gewaschen und über Nacht luftgetrocknet. Je nach verwendetem Antikörper konnten die Präparate mit Uranylacetat und/ oder Bleicitrat kontrastiert werden. Die Auswertung und Photodokumentation erfolgte wie oben angegeben.

ANTIKÖRPER	HERSTELLER	VERDÜNNUNG
Neuronen- spezifische Enolase		
polyklonal	DAKO; Hamburg	1:100
Neurofilament		
monoklonal	DAKO; Hamburg	1 : 50
VIP		
polyklonal	Chemicon, Temecula, USA	1 : 250
CGRP		
polyklonal	Peninsula;Belmont, USA	1 : 100
SP		
polyklonal	Affiniti; Exeter, UK	1 : 2000
NPY		
polyklonal	Chemicon,Temecula, USA	1 : 800
bNOS		
polyklonal	Transduction Lab.; Lexington, USA	1 : 200
eNOS		
polyklonal	Transduction Lab.; Lexington, USA	1 : 400

Tabelle 3 mit den Antikörpern	für die Immunel	ektronenmikroskopie
-------------------------------	-----------------	---------------------

4. Ergebnisse

4.1 Zur Morphologie der Nasenschleimhaut

Bei den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich ein zum Teil mehrreihiges, auch teils flaches hochprismatisches Flimmerepithel mit zilientragenden Zylinderzellen, Becherzellen und Basalzellen auf einer unterschiedlich stark ausgeprägten Basalmembran (Abb.2a,2b,3a,4). Nach einer an Kapillaren und Nervenfasern reichen subepithelialen Schicht (2a,2b,3b) finden sich die seromukösen Drüsenkomplexe der Lamina propria mucosae (Abb.3a,4). Im subepithelialen Bindegewebe verlaufen zahlreiche nicht myelinisierte Nervenfasern (Abb.3b). Zwischen dem Drüsenlager und den tiefliegenden Knochenlamellen des Os turbinale befindet sich das ausgedehnte Gefäßnetz der Nasenmuschel mit aufsteigenden Rankenarterien, Arteriolen, zahlreichen Kapillaren, weiten venösen Sinusoiden, Drosselvenen sowie freien Muskelzellen (Abb.4). Die von Perizyten umgebenen Kapillaren zeigen in der Nähe des Epithels und im periglandulären Bindegewebe ein gefenstertes Endothel (Abb.5a). Diese durch Diaphragmata verschlossenen Fenestrationen sind den Azinuszellen der Drüsen zugewandt (Abb.5b). Endothelzellen und Perizyten sind von einer Basallamina begrenzt.



Abb.2a: Hochprismatisches Flimmerepithel (E) mit Becherzellen (blau). Unter der Basalmembran (BM) Kapillaren (K) und Drüsen (D). Azanfärbung. Originalvergrößerung:x 100



Abb.2b: Unter dem Epithel (E) kapillarreiche Schicht (K) und Drüsenzellen (D). Toluidinblaufärbung. Originalvergrößerung:x 100



Abb.3a: Übersichtsdarstellung der Lamina propria mucosae. Unter Epithel (E) und Basalmembran (BM) seromuköse Drüsenkomplexe (D). Venöser Sinusoid (S) mit Erythrozyten. Haematoxylin-Eosin-Färbung. Originalvergrößerung:x 80



Abb.3b: Elektronenmikroskopische Darstellung der subepithelialen Region. Unter dem Epithel (E) im kollagenreichen Bindegewebe nicht myelinisierte Nervenfasern (N). Anschnitt einer Drüse (D). Originalvergrößerung:x 4400



Abb.4: Übersichtsdarstellung der unteren Nasenmuschel. Unter dem Epithel (E) ausgedehnte Drüsenkomplexe (D). Muskelstarke Vene (V) und venöse Sinusoide (S). Haematoxylin-Eosin-Färbung. Originalvergrößerung:x 60



Abb.5a: In direkter Beziehung zur Drüse (D) befindliche Kapillare (K) mit 3 Erythrozyten. Fenestrationen am unteren Bildrand. TEM, Originalvergrößerung:x 7000



Abb.5b: Detailvergrößerung einer kapillären Endothelzelle. Fenestrationen (Pfeile) mit Diaphragmata. Lumen (L). TEM, Originalvergrößerung:x 85000

4.2 Morphologie der seromukösen Drüsen

In der Nasenschleimhaut des Menschen konnten sowohl seröse, muköse als auch gemischte seromuköse Drüsenkomplexe gefunden werden (Abb.6). Erst im elektronenmikroskopischen Schnittbild zeigt sich der polare Zellaufbau der Azinuszellen. Im basalen Abschnitt befindet sich der Zellkern mit kondensiertem Chromatin, im supranukleären Zellbereich das rauhe endoplasmatisches Retikulum und der Golgi-Apparat und am apikalen Zellpol zahlreiche membranbegrenzte Sekretgranula (Abb.7a.7b). In den Azinuszellen können reichlich Mitochondrien vom Crista-Typ nachgewiesen werden. Hinweisend auf das Vorliegen einer serösen Drüse sind die elektronendichten Granula, die gut abgrenzbar erscheinen (Abb.7b). Die im apikalen Bereich mit kurzen Mikrovilli besetzten Azinuszellen verjüngen sich zu einem schmalen Lumen, in das die Sekretgranula via Exozytose abgeben werden (Abb.7c). Der gesamte Drüsenzellkomplex aus einzelnen Azinuszellen wird von einer Basallamina umgeben. An der Oberfläche der Drüsenendstücke und im Bereich der Drüsenausführungsgänge finden sich vereinzelt dem basalen Zellpol anliegende filamentreiche Myoepithelzellen (Abb.7a). Besonders im apikalen Zellbereich sind die Azinuszellen über Desmosomen oder "tight junctions" verzahnt (Abb.7c).


Abb.6: Gemischte seröse und muköse Drüsen (D) mit Ausführungsgang (AG) unter dem Epithel (E). Muskelstarke Venen (V). Van Gieson Färbung. Originalvergrößerung:x 60



Abb.7a: Elektronenmikroskopische Übersicht von Azinuszellen. Basal gelegene Zellkerne (ZK). Exozytose eines Sekretvesikels (Pfeil) in das Lumen (L). Myoepitelzelle (MZ). TEM. Originalvergrößerung:x 3000



Abb.7b: Seröse Drüse mit Exozytose (Pfeile) der Sekretgranula in das Lumen (L). Basisnah gelegene chromatinreiche Zellkerne (ZK). Im Randbereich periglanduläres Bindegewebe. TEM. Originalvergrößerung:x 3000



Abb.7c: Zahlreiche Sekretgranula vor der Exozytose in das Drüsenlumen (L). Apikaler Zellbesatz mit Mikrovilli. Zellverbindungen in Form von Desmosomen (Pfeile). TEM. Originalvergrößerung:x 12000

4.3 Lichtmikroskopische Darstellung der periglandulären

Nervenversorgung

In den routinemäßig verwendeten Färbungen von Gewebeschnitten der unteren Nasenmuschel (z.B. Haematoxylin-Eosin Färbung) können die Nerven der Nasenschleimhaut auf Grund der fehlenden Kontrastierung zu umliegenden Strukturen nur unzureichend dargestellt werden. Der Einsatz von Antikörpern gegen neuronale Bestandteile ermöglicht jedoch eine Identifikation von Nerven im Gewebeverband.

4.3.1 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Durch Inkubation der Präparate mit Antikörpern gegen die neuronenspezifische Enolase konnte eine übersichtliche lichtmikroskopische Darstellung der Nerven in der unteren Nasenmuschel an Paraffin- und Gefrierschnitten erreicht werden. Die Nervenbündel und die sich verzweigenden Nervenfasern wurden durch eine rote Färbung gegenüber dem umliegenden Gewebe identifiziert. In der Tiefe der Lamina propria mucosae finden sich kaliberstarke, dicke, periostnahe Nervenbündel, von denen Nervenfasern, die bis in die subepitheliale Region ziehen, abzweigen (Abb.8). In der unmittelbaren Umgebung der seromukösen Drüsen finden sich schmale Nervenfaserbündel, von denen einzelne Neurone zu den Azinuszellen führen. Im periglandulären Bindegewebe konnten geflechtartige Nervenaufzweigungen um die Außenwandung der Drüsen gefunden werden. Zwischen den einzelnen Azinuszellen bzw. in Nähe des Drüsenlumens wurden keine Nervenfasern gesehen. In der Umgebung der Drüsenausführungsgänge zeigte sich ebenfalls eine dichte Innervation. Das mit NSE-Ak darstellbare subepitheliale Nervennetz steht mit den periglandulären Nerven in Verbindung. Im Epithel, der Basalmembran sowie in direkter Beziehung zu periglandulären Kapillaren wurden keine NSE-positiven Nervenfasern nachgewiesen.



Abb.8: NSEpositive Nerven (Pfeile) in der Adventitia einer Arterie (A) und im Bindegewebe der Drüsen (D). An Venen (V) nur vereinzelt Immunreaktionen. ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 150

4.3.2 Neurofilament

Mit Hilfe von Antikörpern gegen Zytoskelettproteine der peripheren Neurone (Neurofilamente) konnten die Ergebnisse der NSE-Immunreaktionen bestätigt und die gleiche Verteilung der Nervenfasern im Bereich der Drüsen festgestellt werden. Die peripheren Neurone in der Nasenschleimhaut konnten mit diesem Antikörper zum Teil noch genauer bis zu feinsten Aufzweigungen dargestellt werden (Abb.9a). Nervenfaserbündel wurden hintergrundfrei direkt an den Azinuszellen dargestellt (Abb.9b,9c). Positive Immunreaktionen zeigten sich auch an Arterien und Arteriolen in der Nähe der Drüsen.

4.3.3 S-100 Protein

Auch mit dem Marker der Schwann-Zellen konnten immunreaktive nervale Strukturen in der Umgebung der seromukösen Drüsen markiert werden. Es zeigten sich, wie bei den NSE- und Neurofilamentmarkierungen, periglanduläre und subepitheliale Nervenfasern (Abb.10). In einigen Abschnitten der Drüsenkomplexe wurde S-100 Protein auch intraglandulär nachgewiesen.



Abb.9a: Markierung von Nervenfasern (N, Pfeile) an Drüsenzellen (D) mit NF-Antikörper. ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 150



Abb.9b: Neurofilament-positiver Nerv (N) im periglandulären Bindegewebe. Drüse (D). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 200



Abb.9c: Nervenfasern (Pfeile) an der Außenwandung einer serösen Drüsenzelle (D). Venöser Sinusoid (S) ohne Hinweis für Innervation. ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 150



Abb.10: S-100 Protein-immunreaktives Nervenfaserbündel (N) und feine Nervenfasern (Pfeile) an seromukösen Drüsen (D). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 200

4.3.4 Cholinerge Innervation

Zum Nachweis der cholinergen Innervation der Drüsen wurden monoklonale und polyklonale Antikörper gegen die Cholinazetyltransferase verwendet. In den kaliberstarken Nervenbündeln der tiefen Schicht der Nasenschleimhaut zeigten sich gemeinsam verlaufende cholinerge und adrenerge Nervenfasern. In den periglandulären Nervengeflechten konnte ein hoher Anteil cholinerger Neurone identifiziert werden. Die Farbintensität war zum Teil sehr schwach, so dass zusätzlich das histochemische Verfahren nach Karnovsky und Roots, ebenfalls an Gefrierschnitten, angewandt wurde. Besonders durch den histochemischen Nachweis der Azetylcholinesterase als intensives, braunschwarzes Reaktionsprodukt konnte die dichte cholinerge Innervation an den seromukösen Drüsen dargestellt werden. Es zeigten sich korbartige Nervenverzweigungen um die Azinuszellen, die Drüsenausführungsgänge und im Bindegewebe zwischen den Drüsenkomplexen (Abb.11a,11b).



Abb.11a: Histochemische Markierung der Azetylcholinesterase in cholinergen Nervenfaserbündeln (N) und einzelnen Nerven (Pfeile) an den Drüsen (D). Epithel (E).

Originalvergrößerung:x 80



Abb.11b: Cholinerges Nervenfaserbündel (N) und feine, korbartige Nervenfasern (Pfeile) an den Drüsenzellen (D). Venöser Sinusoid ohne Markierung. AChE-Histochemie. Originalvergrößerung:x 100

4.3.5 Adrenerge Innervation

Mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase konnten sympathische Nervenfasern markiert werden. In dicken Nervenfaserbündeln waren jedoch im Vergleich zu den NSE- und NF-Markierungen wesentlich weniger Neurone immunreaktiv darstellbar. Hier zeigte sich, wie schon bei der cholinergen Innervation beschrieben, ein gemeinsames Auftreten von immunreaktiven adrenergen Nervenfasern mit cholinergen Nerven in dicken Nervenbündeln. In der Adventitia von Arterien und besonders an Arteriolen in Nähe der Drüsenkomplexe fanden sich Tyrosinhydroxylase-positive Nervenfasern. An den Drüsenazini waren im Vergleich zur cholinergen Innervation nur vereinzelt immunreaktive Nervenfasern darstellbar (Abb.12).



Abb.12: Drüsenkomplex (D) und Darstellung eines noradrenergen Nervenfaserbündels (N) und feiner Nervenfasern (Pfeile) im periglandulären Bindegewebe und an einer Arterie (A). ABC-Methode.

Originalvergrößerung:x 100

4.3.6 Neuropeptiderge Innervation

Die als Neurotransmitter agierenden Neuropeptide VIP, CGRP, SP und NPY konnten in Nerven der respiratorischen Nasenschleimhaut nachgewiesen werden. Die Verteilung und Konzentration der Neuropeptide in periglandulären Nerven wies sehr starke Unterschiede auf. Im Vergleich zur Darstellung der Grundinnervation (z.B. NSE) und der klassischen Neurotransmitter war der immunhistochemische Nachweis der Neuropeptide auf Grund der geringen Gewebekonzentrationen wesentlich schwieriger zu führen. Als geeignete Technik erwies sich der Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen mit der ABC-Methodik an Gefrierschnitten. Da nicht jede Antikörper verschiedener Hersteller verwendet werden.

4.3.6.1 VIP

Die aussagekräftigsten Ergebnisse konnten durch die Inkubation mit dem polyklonalen VIP-Ak (Peninsula) und der ABC-Methode erreicht werden. In dicken Nervenfaserbündeln zeigten sich einzelne VIP-immunreaktive Fasern (Abb. 13a). In vorher als Nervenfasern identifizierten Strukturen konnte in direktem Kontakt zur Außenwandung der Drüsenzellen und zwischen den Drüsenkomplexen VIP in Form feiner Varikositäten nachgewiesen werden (Abb.13b). Im umgebenden Bindegewebe der Ausführungsgänge zeigten sich immunreaktive, VIP-haltige Nervenfasern (Abb.13c). Unter der Inkubation mit dem VIP-Rezeptor-Antikörper färbten sich die Azinuszellen.



Abb.13a: Nervenbündel (N) mit VIPpositiven Nerven (Pfeile). Periglanduläre Nervenfasern an einer Drüse (D). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 220



Abb.13b: VIP-haltige Nervenfasern (Pfeile) in direkter Beziehung zu den Azinuszellen der Drüsen (D). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 200



Abb.13c: Subepithelialer Drüsenausführungsgang (AG). In unmittelbarer Umgebung VIPimmunreaktive Nervenfaser (Pfeile). Venöser Sinusoid (S). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 200

4.3.6.2 CGRP

Positive Immunreaktionen konnten mit allen in Tabelle 2 aufgeführten Antikörpern gegen CGRP beobachtet werden. Auf Grund der niedrigen Gewebekonzentration von CGRP waren verschiedene Ak-Verdünnungsreihen bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen notwendig. CGRP-positive Nervenfasern stellten sich in Form von feinen Varikositäten in Nervenbündeln und in feinen periglandulären Nerven dar (Abb.14a,14b). Ein direkter Kontakt zu den Azinuszellen konnte nur vereinzelt beobachtet werden. In der Nähe von Ausführungsgängen und besonders im subepithelialen Bindegewebe stellten sich fein verzweigte CGRP-immunreaktive Nervenfasern dar, die stellenweise bis zur Basalmembran reichten, diese aber nicht penetrierten. Im Bereich des Epithels konnten keine CGRP-haltigen Fasern markiert werden.



Abb.14a: CGRP-positive Nervenfasern (Pfeile) als feine Varikositäten im periglandulären Bindegewebe. Drüse (D). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 180



Abb.14b: Unter dem Epithel (E) gelegene CGRP-immunreaktive Nervenfaser (Pfeile) an seromukösen Drüsen (D). Kapillare (K). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 180

4.3.6.3 SP

Der Nachweis von SP in peripheren Nerven der Nasenschleimhaut gestaltete sich auch bei Anwendung verschiedener Antikörperchargen schwierig. Vereinzelt konnten in dicken Nervenbündeln SP-positive Nervenfasern markiert werden (Abb.15a). In identischen Regionen der CGRP-Versuche stellten sich im periglandulären Bindegewebe (Abb.15b) und im subepithelialen Bindegewebe (Abb.15a) immunreaktive Nervenfasern dar.



Abb.15a: Nachweis von SP-positiven Nervenfasern (Pfeile) direkt unter dem Epithel (E), an einer Drüse (D) und in einem Nervenfaserbündel (N). ABC-Methode. Originalvergrößerung: x 120



Abb.15b: Feine SP-haltige Nerven (Pfeile) an seromukösen Azinuszellen (D). Venöser Sinusoid (S). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 200

4.3.6.4 NPY

Der Neurotransmitter NPY wurde in der Adventitia von Arterien und insbesondere an Arteriolen in unmittelbarer Umgebung der seromukösen Drüsen in perlschnurartiger Anordnung dargestellt (Abb.16a). Die kleinen, von einer 1 bis 2schichtigen Tunica muscularis begrenzten Arteriolen zeigten eine besonders intensive Innervation durch NPY-Nervenfasern, während die venösen Gefäße und venösen Sinusoide keine immunreaktiven Strukturen aufwiesen (Abb.16b). Eine direkte Innervation der Tunica muscularis konnte nicht gefunden werden. Zum Teil zweigten von den adventitiellen Nerven einzelne Fasern zu den umliegenden Drüsen ab (Abb.16c,16d). Einzelne NPY-Fasern fanden sich an der Außenwandung der Azinuszellen. Auch im subepithelialen Bindegewebe zeigten sich NPY-positive Nervenfasern. Im Vergleich zur Darstellung der noradrenalinhaltigen Nerven konnte ein ähnliches Verteilungsmuster im Sinne einer Kolokalisation von NPY-haltigen Nerven in der Nasenschleimhaut beobachtet werden.



Abb.16a: Querschnitt einer dickwandigen Arterie (A) mit zirkulär in der Adventitia verlaufenden, NPY-positiven Nervenfasern (Pfeile). NPYimmunreaktives Nervenbündel (N) und NPY-negative Kapillaren (K) in der Nähe. ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 100



Abb.16b: Drüsen (D) mit NPY-haltigen Nervenfasern (N, Pfeile) in der Adventitia von Arteriolen (Art) und im periglandulären Bindegewebe. Das benachbarte venöse Gefäß (V) zeigt keine immunreaktiven Nervenfasern. ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 120



Abb.16c: Rankenarterie (A) und Drüse (D) mit versorgender NPY-positiver Nervenfaser (Pfeile). Keine Immunreaktionen an Venen (V). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 120



Abb.16d: Unterhalb des Epithels (E) NPY-immunreaktive Nervenfasern (Pfeile) um einen Drüsenausführungsgang (AG). an einer Arteriole (Art) und im drüsennahen (D) Bindegewebe. ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 80

4.3.7 Stickstoffmonoxidnachweis

Zur Markierung von Stickoxiden (NO) in der Nasenschleimhaut eignet sich vorrangig der Nachweis von Enzymen, die an der NO-Synthese beteiligt sind. Die NADPH-Diaphorase kann mit einem histochemischen Verfahren, modifiziert nach Vincent und Kimura, nachgewiesen werden.

4.3.7.1 NADPH-d

Das blaue Reaktionsprodukt bei NADPH-d-positiver Reaktion konnte sowohl in Nerven als auch im Epithel und Gefäßendothelien dargestellt werden. NO-haltige Nerven zeigten sich in allen Regionen der unteren Nasenmuschel, so auch im periglandulären Bindegewebe und im Subepithel. Durch den NADPH-d Nachweis war die Lokalisation aller in der Nasenschleimhaut vorliegenden NO-Isoformen möglich. Das blaue Reaktionsprodukt ließ sich jedoch durch eine ebenfalls blaue Gegenfärbung mittels Hämalaun nur schlecht kontrastieren.

4.3.7.2 NADPH-d/ AChE-Doppelfärbung

Zur komplexen Darstellung der nitrergen-cholinergen Koinnervation eignete sich NADPH-d/ AChE-Doppelfärbung. Die NO-haltigen eine Nervenfasern unterschieden sich durch eine dezente Blaufärbung von den Azetylcholinesterasehaltigen Nerven (braune Färbung). Die Azetylcholinesterase-Aktivität war deutlich stärker ausgeprägt als die NADPH-Diaphorase-Aktivität. Es zeigten sich braunblau-gefärbte Nervenfasern, die teils korbartige Verzweigungen um die Azinuszellen bilden (Abb.17a,17b). In der Umgebung von Drüsenausführungsgängen konnten ebenfalls nitrerg-cholinerge Nervenfasern nachgewiesen werden.



Abb.17a: Darstellung der cholinergnitrergen Koinnervation. Braun gefärbte cholinerge Nervenfasern mit blau gefärbten nitrergen Fasern (Pfeile) an Drüsenzellen. NADPH-d/AChE-Doppelhistochemie. Originalvergrößerung:x 320



Abb.17b: Dichtes Netzwerk cholinerger Nerven (braun) mit nitrergen Nervenfasern (Pfeile) um Azinuszellen. NADPH-d/AChE-Doppelhistochemie. Originalvergrößerung:x 320

4.3.7.3 Verteilung von nNOS und eNOS

Die an der Stickoxidsynthese beteiligten NO-Synthasen (NOS) können mit immunhistochemischen Methoden in der Nasenschleimhaut nachgewiesen werden. Zur Markierung der in Axonen vorkommenden NOS-Isoform wurden polyklonale Antikörper gegen die neuronale (n) NOS verwendet. Es zeigten sich positive Immunreaktionen in Nervenfaserbündeln (Abb.18a) und in Nervenfasern in Form von feinen Varikositäten im drüsennahen Bindegewebe (Abb.18b) und an Drüsenausführungsgängen (Abb.18c). In einigen Schnitten konnten ein direkter Kontakt der nNOS-positiven Fasern mit den Drüsenzellen festgestellt (Abb.18b) werden. Die nNOS-positiven Befunde in neuronalen Strukturen der Nasenschleimhaut stimmten mit den Ergebnissen der NADPH-Diaphorase-Versuche überein. Auch hier konnten in dicken Nervenbündeln einzelne immunreaktive Nervenfasern identifiziert werden.

Mit Antikörpern gegen die endotheliale (e) NOS war eine Markierung in Gefäßendothelien möglich. Besonders intensive Immunreaktionen wurden in periglandulären, periduktalen (Abb.19a,19b) subepithelialen Kapillaren (Abb.19c) und Arteriolen sowie in Arterien gefunden.





Abb.18a: Querschnitt eines Nervenfaserbündels mit einzelnen nNOSpositiven Axonen (Pfeile). ABC-Methode.

Abb.18b: Immunhistochemische Markierung von nNOS-haltigen Nervenfasern (Pfeile) mit direktem Kontakt zu den Drüsenzellen (D). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 180

Originalvergrößerung:x 320



Abb.18c: Subepithelialer Bereich mit Nachweis von nNOS-haltigen Nerven (Pfeile) in der Umgebung von Drüsen (D) und Ausführungsgängen AG). ABC-Methode. Originalvergrößerung: x 260



Abb.19a: Immunhistochemische Markierung von eNOS im Endothel von periglandulären Kapillaren (Pfeile) und in einer angeschnittenen Arteriole (Art). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 200



Abb.19b: Drüsenausführungsgang (AG) mit umgebenden eNOS-immunreaktiven Kapillaren (Pfeile) im subepithelialen Bindegewebe. ABC-Methode.

Originalvergrößerung:x 180



Abb.19c: Subepitheliale Lage eNOS-haltiger Kapillaren (K). Epithel (E). ABC-Methode. Originalvergrößerung:x 220

4.4 Elektronenmikroskopischer Nachweis der Drüseninnervation

Zur Bestätigung der lichtmikroskopischen Befunde sowie zur genauen Lokalisation von nervalen Strukturen an den seromukösen Drüsen wurden transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die ultrastrukturelle Suche nach Nervenfasern in der Nasenschleimhaut gestaltete sich schwierig, da methodisch bedingt nur sehr kleine Gewebeproben zur Untersuchung kamen. Durch intensives, systematisches Durchmustern der Präparate konnten jedoch Nervenfaserbündel und einzelne Nerven identifiziert werden. In der Lamina propria mucosae finden sich elektronenmikroskopisch kaliberstarke Nervenbündel, die aus myelinisierten (markhaltigen) und nicht myelinisierten Nervenfasern zusammengesetzt sind (Abb.20a). Die kleineren Nervenfaserbündel bestehen überwiegend aus nicht myelinisierten Nerven (Abb.20b). Der grundsätzliche Aufbau dieser periglandulären Nerven aus Neurofibrillen und Neurotubuli gleicht dem peripherer Nerven anderer Körperregionen. Im Axoplasma finden sich auch zahlreiche Mitochondrien. Als Charakteristikum für nicht myelinisierte Nerven werden mehrere Nervenfasern von nur einer Schwann-Zelle umhüllt (Abb.20c).



Abb.20a: Querschnitt eines Nervenfaserbündels mit myelinisierten (schwarze Myelinscheide) und nicht myelinisierten Axonen (AX). Mitochondrien (M). Schwann-Zelle (SZ). Originalvergrößerung:x 12000



Abb.20b: Nicht myelinisierter Nerv im periglandulären Bindegewebe umgeben von Kollagenfibrillen. Im Axoplasma (AX) Neurotubuli, Neurofilamente und Mitochondrien (M). Einscheidung durch Schwann-Zelle (SZ). "Dense core vesicles" (Pfeile). Originalvergrößerung:x 20000



Abb.20c: Nicht myelinisiertes Nervenfaserbündel. Schwann-Zellen mit zentral gelegenem Zellkern (ZK) umgeben mehrere Axone (AX). Intraaxonal dense core vesicles (Pfeile). Originalvergrößerung: x7000

Auch im Elektronenmikroskop konnten Nervenfasern in direkter Beziehung zu den Azinuszellen dargestellt werden. Einige nicht myelinisierte Nerven wurden direkt an der basalen Außenwandung der Drüsen identifiziert (Abb.20d,20e). Nervenfasern zwischen den Azinuszellen oder an den Myoepithelzellen konnten nicht beobachtet werden.



Abb.20d: Nicht myelinisierter Nerv (N) im periglandulären Bindegewebe mit enger Lagebeziehung zu Drüsenzellen (D) von feiner Basallamina umgeben. Zellkerne (ZK). Originalvergrößerung:x 2800



Abb.20e: Axone eines nicht myelinisierten Nervens mit Mitochondrien (M) zwischen Drüsenkomplexen. Intraaxonal Darstellung von cholinergen (lange Pfeile) und neuropeptidhaltigen (kurzer Pfeil) Vesikeln. Zellkerne der Drüsen (ZK). Originalvergrößerung:x 12000

Neuroglanduläre Kontaktstellen können nur in einigen wenigen Regionen dargestellt werden (Abb.20f). In diesen, nur vereinzelt zwischen den Drüsenzellen gelegenen, Synapsen konnten unterschiedliche Vesikel gefunden werden. In einigen Nervenendigungen lassen sich neuropeptidhaltige elektronendichte Vesikel bzw. sogenannte "dense core vesicles" nachweisen (Abb.20g).



Abb.20f: Darstellung von serösen Drüsenzellen mit Sekretgranula. Drüsenlumen (L). Neuroglanduläre Synapse (lange Pfeile) mit "dense core vesicles". Interzelluläre Verbindung durch Desmosomen (kurze Pfeile). Originalvergrößerung:x 20000



Abb.20g: Ausschnittsvergrößerung von Abb.20f. Lokalisation der neurovesikelhaltigen Nervenendigung zwischen den Drüsenzellen. Dense core vesicles (Pfeile). Originalvergrößerung:x 50000

Ultrastrukturell kann zusätzlich eine Differenzierung in noradrenerge und cholinerge Axone vorgenommen werden. Die Axone wiesen im Bereich der neuroglandulären Synapsen keine Schwann- Zellen auf. Die Synapsen enthielten eine hohe Anzahl von verschiedenen Transmittervesikeln und Mitochondrien. Die kleinen (45nm) und teilweise bis zu 60nm messenden noradrenergen kernhaltigen Vesikel sind von einem hellen Hof umgeben. Cholinerge Varikositäten enthalten kleine (40nm) elektronenleere Vesikel (Abb.20h). Die kernhaltigen "dense core vesicles" (30-60nm), die auch in neurosekretorischen Axonen vorkommen, zeigen unterschiedliche Form und Größe.



Abb.20h: Neuroglanduläre cholinergen, Synapse mit elektronenleeren Vesikeln (kurze Pfeile) und neuropeptidhaltigen "dense core vesicles" (lange Pfeile).

Eine Besonderheit stellt das Vorkommen von fenestrierten Kapillaren im subepithelialen Bereich sowie in der Nähe der Drüsenkomplexe dar (Abb.21). Die Wand dieser feinen Blutgefäße besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, die von Perizyten umgeben sind. Das den Drüsenzellen zugewandte Endothel zeigte vereinzelte Fenestrationen, die durch membranartige Strukturen verschlossen waren. In der Nähe der Kapillaren wurden keine Axone gefunden.



4.5 Immunelektronenmikroskopische Befunde

mit

flachen Endothels. Lumen (L). Anschnitt des

Abb.21:

Kapillare

Zellkerns (ZK) eines Perizyten. Originalvergrößerung:x 15000

Nachweis verschiedener Neurotransmitter in den periglandulären Zum Nervenfasern und neuroglandulären Synapsen wurden immunelektronenmikroskopische Verfahren angewendet. Die Methode erwies sich als wesentlich sensibler als die lichtmikroskopischen, immunhistochemischen Versuche. So mussten beim Auftreten von starker Hintergrundfärbung durch unspezifische Reaktionen des Gewebes bzw. bei Überlagerungen durch Kontrastierungsstörungen die Versuchsreihen mehrfach unter veränderten Bedingungen und Kontrastierungsverfahren wiederholt werden.

4.5.1 NSE und NF

Zunächst wurden Vorversuche mit Primärantikörpern gegen die neuronenspezifische Enolase und Neurofilament durchgeführt. Dabei zeigten sich ausschließlich im Axoplasma positive Immunreaktionen in Form von kleinen (10nm) schwarzen Ablagerungen der Goldkomplexe. Eine Anfärbung der Schwann- Zellen, der umliegenden Gewebebezirke und speziell der Azinuszellen war nicht festzustellen. Somit konnten mittels neurogener Marker positive immunelektronenmikroskopische Reaktionen intraaxonal nachgewiesen werden.

4.5.2 Nachweis der Neuropeptide

Mit den in Tabelle 3 aufgeführten Primärantikörpern konnten ebenfalls positive Immunreaktionen im Transmissionselektronenmikroskop dargestellt werden.



Abb.22: Querschnitt eines Axons mit CGRP-Immunreaktion in einem "dense core vesicle". Neurotubuli (Pfeile). Originalvergrößerung:x 85000



Abb.23: Periglanduläre Axone (AX) mit SPimmunreaktiven "dense core vesicles" (Pfeile) und Goldmarkierung im Axoplasma. Originalvergrößerung:x 50000

Die Neuropeptide VIP, CGRP, SP und NPY konnten ausschließlich in Axonen der Nasenschleimhaut nachgewiesen werden. In den periglandulären Nerven wurden unterschiedlich intensive Immunreaktionen beobachtet. Intraaxonale Immunogold-Ablagerungen zeigten sich je nach inkubiertem Antikörper gegen CGRP (Abb.22), SP (Abb.23), VIP (Abb.24) und NPY (Abb.25). CGRP wurde meist an "dense core vesicles" gebunden (Abb.22), SP, NPY und VIP auch diffus im Axoplasma nachgewiesen. den subepithelialen Nervenfasern In konnte immunelektronenmikroskopisch vorwiegend CGRP und SP identifiziert werden (Abb.26). Immunreaktionen in "dense core vesicles", die unterschiedliche Größe aufwiesen, zeigten sich für alle o.g. Neuropeptide. Eine extraaxonale Lokalisation der untersuchten Neuropeptide fand sich nicht. Insbesondere wurden keine Immunreaktionen in der Tunica muscularis der Gefäße beobachtet.



Abb.24: Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von VIP in "dense core vesicles" (Pfeile) und im Axoplasma (AX). Originalvergrößerung:x 30000



Abb.25: Lokalisation von NPY in "dense core vesicles" (lange Pfeile) und im Axoplasma eines periglandulären Axons. Neurotubuli (kurze Pfeile). Originalvergrößerung: x 50000



Abb.26: SP-immunreaktive Axone (AX) mit "dense core vesicles" (Pfeile) im subepithelialen Bindegewebe. Originalvergrößerung:x 50000

4.5.3 Verteilung von nNOS und eNOS

Auch die Lokalisation von Stickoxid konnte durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen konkretisiert werden. Nach Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper gegen nNOS wurden positive Immunreaktionen in Form feiner Goldpartikelmarkierungen in periglandulären und periarteriellen Axonen gefunden (Abb.27). Die Goldablagerungen waren nur im Axoplasma nachweisbar. Eine Beziehung zu "dense core vesicles" konnte nicht beobachtet werden. Im extraaxonalen Gewebe war nNOS nicht lokalisierbar. Die immunhistochemischen Versuchen nachgewiesenen NO-haltigen in den subepithelialen Nervenfasern konnten auch immunelektronenmikroskopisch beobachtet werden. Im respiratorischen Epithel fanden sich keine Nervenstrukturen.



Abb.27: Positive Immunreaktion auf anti-nNOS im Axoplasma eines periglandulären Nervens. Die Goldpartikel befinden sich im Bereich der Neurotubuli (kurze Pfeile), die "dense core vesicles" (lange Pfeile) zeigen keine Immunreaktion. Originalvergrößerung:x 50000 Der Nachweis der eNOS gestaltete sich durch Überlagerungen bei der Kontrastierung als schwierig. Um hintergrundfreie Immunreaktionen darstellen zu können wurde eine Einfachkontrastierung mit wässrigem 2%igem Uranylacetat durchgeführt. In den subepithelialen und periglandulären Kapillaren und drüsennahen Arteriolen war eine besonders starke Akkumulation von Goldpartikeln zu beobachten (Abb.28a). Es zeigte sich ein spezifischer Nachweis von eNOS im Zytoplasma der lumenbegrenzenden Endothelzellen (Abb.28b). Der Zellkern wies vereinzelt positive Immunreaktionen auf. Eine genaue Lokalisation von eNOS an spezialisierten Zellorganellen war nicht möglich. Im Zytoplasma von Fibroblasten konnte ebenfalls eNOS nachgewiesen werden (Abb.28c). Die seromukösen Azinuszellen und die Zellen der Ausführungsgänge zeigten im Zytoplasma starke eNOS-Immunreaktionen (Abb.28d).



Abb.28a: Lokalisation von eNOS im Endothel einer periglandulären Kapillare Lumen (L). Im Vergleich zum Zytoplasma weist der Zellkern (ZK)nur einzelne Immunreaktionen auf. Originalvergrößerung: x 30000

Abb.28b: Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von eNOS im Zytoplasma und vereinzelt im Zellkern (ZK, Pfeile) einer kapillären Endothelzelle. Lumen (L). Originalvergrößerung:x 30000





Abb.28c: Fibroblast im perikapillären Bindegewebe mit starker eNOS-Immunreaktivität im Zytoplasma, während der Zellkern (ZK) nur einige immunreaktive Bereiche aufweist.

Originalvergrößerung:x 30000



Abb.28d: Anschnitt von eNOSpositiven Azinuszellen einer Drüse mit basal gelegenen Zellkernen (ZK). Starke Immunreaktionen vorwiegend im Zytoplasma. Originalvergrößerung: x 12000

4.6 Morphologische Befunde bei Rhinopathien

4.6.1 Zystische Fibrose

Im Vergleich zur normalen Nasenschleimhaut zeigte sich lichtmikroskopisch ein im Aufbau stark gestörtes, pseudostratifiziertes und massiv verdicktes Epithel mit einem deutlich erhöhten Anteil von Becherzellen (Abb.29a). Zusätzlich fanden sich reichlich Vakuolen im Epithel. Unter einer verbreiterten Basalmembran stellte sich eine ödematöse Lamina propria mucosae mit einer reduzierten Kapillarschicht und pathologisch veränderten Drüsen dar. Es zeigten sich vermehrt muköse Azinuszellen und auffällig zystisch dilatierte Drüsenlumina (Abb.29b). Der basale Teil der seromukösen Drüsen erschien durch die supranukleäre muzinöse Sekretansammlung komprimiert. In einigen Regionen konnten metaplastische Epithelzellen gefunden werden.



Abb.29a: Pseudostratifiziertes und massiv verdicktes Epithel (E) mit zahlreichen Vakuolen. Abgrenzung zur Lamina propria durch verbreiterte Basalmembran (B). Toluidinblaufärbung. Originalvergrößerung:x 160



Abb.29b: Lamina propria mucosae mit pathologisch veränderten, zystisch dilatierten Drüsen (D) und zähem Sekret intraluminal. Anschnitt metaplastisch-veränderter Epithelzellen (links oben). Vene (V). Toluidinblaufärbung. Originalvergrößerung:x 200

Ultrastrukturell zeigten sich vermehrt zilienlose Epithelzellen. Die mit irregulären Mikrovilli besetzten Becherzellen waren massiv mit atypischen, aufgelockerten lysosomalen Granula gefüllt und von einer Mukosschicht bedeckt (Abb.29c). Die Drüsenzellen enthielten reichlich atypische und teils inhomogene Sekretgranula, die z.T. konfluierten. In den Azinuszellen fanden sich größtenteils aufgelockerte Granula und weniger elektronendichte Sekretgranula (Abb.29d). Die basalen Anteile der Drüsenzellen erschienen durch den Sekretstau komprimiert. Im dilatierten Drüsenlumen fand sich massiv muköses Sekret umgeben von in das Lumen hineinragenden Mikrovilli (Abb.29c). Der Zellkern wies kondensiertes Chromatin auf. Im supranukleären Bereich konnten ein hyperplastischer Golgi-Apparat und ein ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum sowie zahlreiche Mitochondrien gefunden werden (Abb.29e). In den periglandulären Kapillaren fanden sich vermehrt aktivierte Endothelzellen. In den Endothelzellen zeigten sich helle Vesikel als Zeichen einer erhöhten Pinozytoseaktivität. Die Kapillaren wiesen die typischen drüsenwärts gerichteten Fenestrationen auf.

Das Innervationsmuster und die Verteilung der Neurotransmitter zeigten keine Besonderheiten im Vergleich zur normalen Nasenschleimhaut.



Abb.29c: Becherzellen mit irregulären Intrazelluläre Mikrovilli. Akkumulation lysosomaler Strukturen (kurzer Pfeil). In benachbarter Epithelzelle Lipidtropfen (langer Supranukleär (ZK) Pfeil). ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum. Auflagerung von mukösem Sekret. TEM. Originalvergrößerung:x 7000



Abb.29d: Azinuszellen (AZ) und Drüsenlumen (L). Maximale Füllung der Zelle mit aufgelockerten Sekretgranula. Anschnitt eines Zellkerns (ZK) mit kondensiertem Chromatin in der benachbarten Zelle. TEM. Originalvergrößerung:x 7000



Abb.29e: Anschnitt mehrerer Azinuszellen mit zentralem Lumen (L). Im apikalen Zellbereich inhomogene Sekretgranula und intraluminale Mikrovilli. In Umgebung des Zellkerns (ZK) ausgeprägter Golgi-Apparat (G), zahlreiche Mitochondrien (M) und rauhes endoplasmatisches Retikulum (lange Pfeile). Desmosomen (kurze Pfeile). TEM.

Originalvergrößerung:x 7000

4.6.2 Allergische Rhinopathie

Im hyperplastischen und teils aufgelockerten Epithel mit zahlreichen Becherzellen konnte eine Einwanderung von lymphoiden Zellen beobachtet werden. Unter der verdickten Basalmembran zeigte sich ein ausgedehntes Ödem der Lamina propria mucosae. Im subepithelialen Bereich fanden sich dilatierte Kapillaren mit hochaktivierten Endothelzellen und zahlreichen konzentrisch proliferierten Perizyten. Die Kapillaren wiesen ausgedehnte Fenestrationen auf, die dem Epithel und den Drüsenzellen zugewandt waren. Im perikapillären Gewebe zeigte sich eine Infiltration mit zahlreichen Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Plasmazellen (Abb.30a).



Abb.30a: Anschnitt einer stark dilatierten Kapillare (K) mit hochaktivierten Endothelzellen (Pfeile). In der ödematösen perikapillären Mukosa Infiltration mit Lymphozyten (LZ) und Makrophagen (MP) mit pseudopodienartigen Ausstülpungen. Plasmazelle (PZ). TEM. Originalvergrößerung:x 3000

In den Mastzellen waren als Zeichen des aktivierten Zustandes feinlamellierte Granula intrazellulär nachweisbar. Ansonsten wiesen sie als typische ultrastrukturelle Merkmale ovaläre Zellkerne, reichlich elektronendichte zytoplasmatische Granula und lange Fortsätze auf. Die Plasmazellen, charakterisiert durch einen exzentrischen Zellkern, zahlreiche Mitochondrien und Strukturen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER), konnten in verschiedenen Aktivierungszuständen beobachtet werden. Die seromukösen Drüsen wiesen vermehrt Speichervesikel, vergrößerte Mitochondrien und ein ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum auf.

In der Umgebung der seromukösen Drüsen, die ebenfalls mit lymphoiden Zellen infiltriert waren, wurden vermehrt nicht myelinisierte Nervenfasern mit "dense core vesicles" gefunden (Abb.30b). Insbesondere konnten diese Nervenfasern vermehrt im stark kollagenisierten Bindegewebe zwischen Epithel und den submukösen Drüsen gezeigt werden. Intraaxonal war hier eine intensive CGRPund Substanz P- Immunreaktivität nachweisbar. Aktivierte Plasmazellen waren in näherer Umgebung und in Kontakt zu neuropeptidhaltigen Axonen zu identifizieren (Abb.30c-e).



Abb.30b: Periglandulärer Nerv. Starke SP-Immunreaktivität intraaxonal (AX) und in "dense core vesicles" (Pfeile). TEM. Originalvergrößerung:x 20000





Abb.30c: Aktivierte Plasmazelle (PZ) mit zahlreichen Mitochondrien und rauhem endoplasmatischem Retikulum in Kontakt zu neuropeptidhaltigen Axon (AX). Dense core vesicles (Pfeile). TEM. Originalvergrößerung:x 30000

Abb.30d: Zwischen Kapillare (L) und Plasmazelle (PZ) gelegener nicht myelinisierter Nerv. Axone (AX) von Schwann-Zelle (SZ) eingehüllt. Dense core vesicle (Pfeil). TEM. Originalvergrößerung:x 30000



Abb.30e: Anschnitt einer Kapillare mit hochaktiviertem Endothel (EZ). Lumen (L). An der Plasmazelle (PZ) neurovesikelhaltige Axone (AX, Pfeile). Lymphozyt (LZ). TEM. Originalvergrößerung: x 12000

4.6.3 Hyperreaktive Rhinopathie

der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigten sich unter einem Bei Epithel mehrreihigen, hochprismatischen eine nur geringfügig mit Entzündungszellen infiltrierte Lamina propria mucosae. Das Schwellgewebe mit den Sinusoiden und den Drüsenkomplexen war in ein stark kollagenisiertes Bindegewebe eingebettet (Abb.31a). Die seromukösen Drüsen stellten sich lichtmikroskopisch ohne Auffälligkeiten dar. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung wiesen die Drüsen vermehrt Mitochondrien und ein ausgedehntes perinukleäres endoplasmatisches Retikulum auf (Abb.31b). Die Kapillaren waren auffällig dilatiert. Die aktivierten Endothelzellen zeigten vermehrt Pinozytosevesikel und sogenannte Stressfilamente (Abb.31c). Eine dichte Versorgung mit nicht myelinisierten Nervenfasern konnte im periglandulären Bindegewebe sowie subepithelial nachgewiesen werden. In den Axonen und Synapsen fanden sich reichlich "dense core vesicles".

Immunelektronenmikroskopisch wurden in diesen Axonen besonders die Neuropeptide Substanz P, CGRP und VIP nachgewiesen (Abb.31d).



Abb.31a: Lamina propria mucosae. Seromuköse Drüsen (D) in stark kollagenisiertes Bindegewebe eingebettet. Venöser Sinusoid (S) mit Erythrozyten. Originalvergrößerung:x 120



Abb.31b: Anschnitt von Drüsenzellen. Zellkerne (ZK) mit kondensiertem Chromatin. Zahlreiche Mitochondrien (M) und ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum (Pfeile). TEM. Originalvergrößerung: x 4400



Kapillare Abb.31c: mit Endothelzelle. veränderter Intrazellulär reichlich Stressfilamente (kurze Pfeile) Durchtritt und von Pinozytosevesikeln (lange Pfeile). Lumen (L), Zellkern (ZK). TEM. Originalvergrößerung: x 50000



Abb.31d: Periglandulärer Nerv mit CGRP-immunreaktiven dense core vesicles (Pfeile). Axone (AX). TEM. Originalvergrößerung: x 30000

5. Diskussion

5.1 Gesamtinnervation der Drüsen

Ziel dieser morphologischen Untersuchungen war die Darstellung der komplexen nervalen Versorgung der seromukösen Drüsen und des umgebenden Gefäßsystems, um Rückschlüsse auf die Regulation der Drüsenfunktionen zu erlangen. Als Grundlage für den Nachweis der Verteilung der wichtigsten Neurotransmitter wurde die immunhistochemische Markierung der gesamten nervalen Strukturen in der Umgebung der Drüsen durchgeführt. Die farbintensive immunhistochemische Darstellung der Nervenstrukturen mit spezifischen Antikörpern gegen neuronale Strukturen (NSE, Neurofilament) und gegen Bestandteile der Schwann- Zellen (S-100 Protein) erlaubte eine genaue morphologische Korrelation zum nahezu hintergrundfrei gefärbten umliegenden Gewebe. Die in zentralen und peripheren Neuronen lokalisierte neuronenspezifische Enolase wurde erstmals von Moore (Moore, 1965; Bishop, 1982) aus dem Rinderhirn isoliert. Nachdem Sheppard 1983 mittels NSE-Antikörpern die Innervation des respiratorischen Epithels der Lunge demonstrierte (Sheppard, 1983), konnte Yamagishi 1989 durch NSE- und S-100 Protein-Immunhistochemie in der olfaktorischen Nasenschleimhaut des Menschen Nervenstrukturen nachweisen (Yamagishi, 1989). Das erstmals 1965 von Moore und McGregor (Moore, 1965; Bock, 1978; Rambotti, 1989) aus dem Rinderhirn isolierte S-100 Protein ist sowohl Bestandteil von zentralen Neurogliazellen als auch von peripheren Schwann-Zellen (Bock, 1978; Schmechel, 1978; Cocchia, 1981; Stefansson, 1982; Kahn, 1983). In den 70 er Jahren des letzten Jahrhunderts beschäftigten sich insbesondere Temesrekasi (Temesrekasi, 1973) und Ishii (Ishii, 1970; 1972) auf lichtmikroskopischer Ebene sowie Cauna (Cauna, 1970; 1972) mit Hilfe des Elektronenmikroskops mit der Innervation der menschlichen Nasenschleimhaut Jahnke wies auf die besondere Bedeutung elektronenmikroskopischer Untersuchungen zur Klärung physiologischer und pathophysiologischer Abläufe bei verschiedenen Rhinopathien hin und berichtete ferner in zahlreichen Publikationen über ultrastrukturelle Befunde der Nasenschleimhaut (Jahnke, 1985; 1987). Dabei wurde jedoch nicht näher auf die Nervenversorgung eingegangen (Jahnke, 1972; 1977; 1983). Mygind und Winther beschäftigten sich vorrangig bei ihren rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Oberflächenveränderungen der Nasenschleimhaut, ohne auf die Drüsen oder die Beteiligung von nervalen Strukturen einzugehen (Mygind, 1973; 1974; Winther, 1984). Basierend auf Techniken wie der Silberimprägnation (Temesrekasi, 1973) oder histochemischen Methoden zur Darstellung cholinerger Nervenstrukturen (Ishii, 1970; Grote, 1975) konnten immer nur Teilaspekte der Gesamtinnervation der Nasenschleimhaut erarbeitet werden. Durch Verzicht auf kontrastschaffende Gegenfärbungen des Gewebes (Temesrekasi, 1973) ergeben sich Interpretationsschwierigkeiten der Befunde. Auch bei der Immunofluoreszenz (Dahlström, 1965; Hauser-Kronberger, 1993) gestaltet sich, im Gegensatz zur Immunhistochemie, eine eindeutige Zuordnung der Nervenfasern zu umliegenden Strukturen deutlich schwieriger. Mit den hier verwendeten immunhistochemischen Techniken konnte eine exakte Darstellung des dichten Innervationsmusters der unteren Nasenmuschel des Menschen und insbesondere der subepithelialen, drüsenreichen Region erfolgen. Schon der Nachweis der Gesamtinnervation verdeutlicht den Stellenwert der nervalen Kontrolle physiologischer Funktionen der seromukösen Drüsen. Ausgehend von den in der Tiefe der Lamina propria mucosae verlaufenden dicken Nervenstämmen zweigen unterschiedlich starke, in Richtung Epithel ziehende Nervenbündel ab. Da die Markierung von Nervenstrukturen mit Hilfe von NSE-, NF- und S-100 Protein-Antikörpern gleiche Verteilungsmuster zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die peripheren Nerven der Nasenschleimhaut in ihrem gesamten Verlauf bis zur Aufzweigung im Bereich der Erfolgsorgane von umhüllenden Schwann-Zellen umgeben sind. Dieser Befund konnte auch ultrastrukturell bestätigt werden. Neben einer intensiven nervalen Versorgung der Arteriolen, Arterien und der Polstervenen (Riederer/Knipping, 1993; 1996) konnte ein dichtes Nervenfasernnetz um die Drüsenkomplexe und im subepithelialen Bindegewebe gefunden werden (Knipping, 1995; 2001; 2002). Die Azinuszellen sind teilweise körbchenartig von feinen Nervenfasern umgeben. Auch im Bindegewebe um die Ausführungsgänge konnten Nerven lichtmikroskopisch markiert werden. Eine direkte Zuordnung der Nervenendigungen zu entsprechenden Strukturen der Drüsen, wie Azinuszellen und myoepithelialen Zellen, oder der Nachweis von neuroglandulären Synapsen konnte mit o.g. Methoden auf Grund des begrenzten Auflösungsvermögens nicht erfolgen.

Durch die zusätzlich verwendeten elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethoden war eine noch detailgetreuere Darstellung nervaler Strukturen im Bereich der Drüsen der menschlichen Nasenschleimhaut möglich. Erst das genaue Durchmustern der ultradünn geschnittenen Präparate im Elektronenmikroskop erbrachte den Nachweis von nicht myelinisierten Nervenfasern in unmittelbarer Nähe der Drüsen und von neuroglandulären Kontaktstellen, wie sie bei vorangegangenen Untersuchungen noch nicht beschrieben wurden (Brettschneider, 1957; Burian, 1963; Jahnke, 1972; 1977; Agha-Mir Salim, 1992; 1998). Im periglandulären Bindegewebe lassen sich zum größten Teil nicht myelinisierte und nur selten myelinisierte Nerven nachweisen. Sie zeigen den typischen Aufbau eines peripheren Nervene mit Neurofilamenten, Neurotubuli sowie Mitochondrien im Axoplasma. Mikrotubuli, die in Form von Neurofilamenten und - tubuli in den Neuronen in Erscheinung treten, dienen dem axoplasmatischen Transport von synaptischen Vesikeln oder neurosekretorischen Granula (Kristic, 1984). Mehrere Nervenfasern unterschiedlichen Kalibers sind von einer Schwann- Zelle umschlossen. In den Axonen und Nervenendigungen konnten elektronendichte, neuropeptidhaltige Neurovesikel in Form von "dense core vesicles" gefunden werden. Von Cauna wurden nur elektronen-negative Vesikel mit positivem AChE-Nachweis, die in parasympathischen Axonen vorkommen, in Drüsennähe beschrieben. Nach diesem, eventuell durch andere Fixationmethoden bedingten Befund postulierte Cauna eine ausschließlich cholinerge Innervation der Drüsen (Cauna, 1972). Bei den hier vorliegenden Untersuchungen konnten zahlreiche periglanduläre Nervenendigungen mit elektronenleeren Vesikeln, die dem parasympathischen System zugeschrieben werden können, identifiziert werden. Des Weiteren fanden sich neben sympathischen kernhaltigen Vesikeln intraaxonale "dense core vesicles", in denen bei immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen die o.g. Neuropeptide lokalisiert wurden. In vereinzelten Regionen wurden Nervenendigungen mit "dense core vesicles" auch zwischen den Drüsenzellen beobachtet. Auf Grund des nur seltenen Auftretens von direkten Kontaktstellen zwischen Nerven und Azinuszellen (neuroglanduläre Synapsen) kann vermutet werden, dass die Drüsenfunktionen im wesentlichen einer Steuerung über sogenannte Synapsen "by distance" unterliegen. Dabei erfolgt die Übertragung der Neurotransmitter zu den Effektorzellen über Diffusion entlang von Bindegewebsspalten und nicht über direkte Kontaktstellen (Kristic, 1984; Schmidt, 1990). Nach der Exozytose der neurotransmitterhaltigen Vesikel kommt es nach Transmitterfreisetzung zur Endozytose der leeren Vesikel und zur Regeneration neuer Vesikel (Südhof, 1995). Die von Cauna angegebene enge Lagebeziehung zwischen Nervenendigungen und myoepithelialen Zellen konnte in den hier vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Der Nachweis von neuroglandulären Kontaktstellen bzw. des periglandulären Verlaufs von Nervenfasern unterlegt auf ultrastruktureller Ebene die Vermutung, dass die verschiedenen Drüsenfunktionen einer direkten nervalen Kontrolle unterliegen.

In den, bei Versuchen zum Nachweis der Gesamtinnervation durch neuronale Marker nachgewiesenen, Nerven konnten an Serienschnitten histochemisch bzw. immunhistochemisch und an Ultradünnschnitten ultrastrukturell folgende vegetative und sensorische Neurotransmitter lokalisiert werden.

5.2 Klassisch-vegetative Innervation

5.2.1 Cholinerge Innervation

Der Nachweis des cholinergen Transmitters Azetylcholin kann einerseits mittels immunhistochemischer Verfahren zur Markierung des Syntheseenzyms Cholinazetyltransferase (ChAT) und andererseits durch histochemische Techniken zum Nachweis des Azetylcholin-hydrolysierenden Enzyms Azetylcholinesterase geführt werden (Karnovsky, 1964). Durch Verwendung von Azetylthiocholin als Substrat kann eine Steigerung der Spezifität erreicht werden (Nomura, 1972). Bereits 1970 beschrieb Ishii mit der histochemischen Methode nach Karnovsky und Roots (Karnovsky, 1964) erstmals die parasympathische Innervation der Drüsen in der menschlichen Nasenschleimhaut (Ishii, 1970). Er zeigte AChEhaltige Strukturen im Bereich der Drüsenkapsel auf, umgebende Nervenfasern kamen nicht zur Darstellung. Dahlström und Fuxe sowie Grote stellten mit einer Fluoreszenztechnik bei verschiedenen Säugetieren keine (Dahlström, 1965) bzw. nur cholinerge periglanduläre Nervenfasern fest (Grote, 1975). An den Ausführungsgängen wurden keine Nervenmarkierungen beschrieben. Auch Nomura und Kamijo belegten einen parasympathischen Einfluss auf die Drüseninnervation (Nomura, 1972; Kamijo, 1993). Von Mullol (1992) konnten die muskarinergen Rezeptoren M1 und M3 an seromukösen Drüsen der Nasenschleimhaut identifiziert werden, über die eine Stimulation der Produktion von mukösen Glycoproteinen erfolgt. Auf Grund dieser Befunde wurde zunächst eine alleinige parasympathisch gesteuerte Drüseninnervation postuliert. Das hier nachgewiesene, dichte cholinerge Nervenfasernetz an den Drüsenendstücken und im Bereich der Ausführungsgänge legt eine dominierende Rolle des Parasympathicus im Sinne einer Sekretionssteigerung der Drüsen nahe. Die Rückresorption von Wasser und Elektrolyten im Ausführungsgangsystem, wie von Lantini und Agha-Mir-Salim vermutet (Lantini, 1990; Agha-Mir-Salim, 1998), könnte unter einer parasympathischen Kontrolle ablaufen. Die Vermutung, dass die Sekretionsmechanismen an den seromukösen Drüsen einer alleinigen parasympathischen Kontrolle unterliegen, kann durch den Nachweis aminerger, peptiderger und nitrerger Neurone nicht mehr aufrecht erhalten werden.

5.2.2 Adrenerge Innervation

Zum Nachweis der adrenergen Innervation kamen spezifische Antikörper gegen ein Syntheseenzym von Noradrenalin, die Tyrosinhydroxylase zum Einsatz. Noradrenalin wirkt als Überträgersubstanz in sympathischen, postganglionären Nerven. Dahlström und Fuxe beschrieben erstmals adrenerge Nervenfasern in der menschlichen Nasenschleimhaut (Dahlström, 1965). Die Ausschüttung von Noradrenalin nach Reserpingabe wurde mit einer Fluoreszenzmethode sichtbar gemacht. Ein Nachweis adrenerger Nerven konnte mit dieser Methode nicht gelingen. Nomura führte mit einer histochemischen Färbung nach Falck fluoreszenzmikroskopisch eine Markierung von einzelnen adrenergen, periglandulären Fasern beim Menschen durch (Nomura, 1972). Änggard wies immunfluoreszenzmikroskopisch eine sympathische Beteiligung an der Drüseninnervation der Katze nach (Änggard, 1974). Schwierigkeiten bei der Interpretation dieser fluoreszenzmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse können durch Autofluoreszenz von elastischen Fasern entstehen (Klaassen, 1988). Sowohl von Hiraide als auch von Baraniuk und Wolf wurde auf eine Mitinnervation der Drüsen der menschlichen Nasenschleimhaut durch sympathische Nervenfasern hingewiesen (Hiraide, 1986; Wolf, 1988; Baraniuk, 1990). Mittels autoradiographischer Untersuchungen wurden von Woodhead adrenerge Rezeptoren an Drüsen und Ausführungsgängen nachgewiesen (Woodhead, 1991). Bei den hier vorliegenden Untersuchungen konnten vereinzelt adrenerge Nervenfasern in der Nähe von Azinuszellen und nur selten an Ausführungsgängen beobachtet werden. Auf Grund des von Woodhead erbrachten Nachweises von Adrenorezeptoren an diesen Strukturen sowie der hier vorliegenden histochemischen und immunhistochemischen Befunde kann von einer gemischten cholinerg-aminergen Innervation an den Drüsen ausgegangen werden. Auch sympathische Einflüsse scheinen für aktive Transportmechanismen und für die Kontrolle der Elektrolytzusammensetzung an den Ausführungsgängen verantwortlich zu sein (Woodhead, 1991). Chen konnte eine glanduläre Sekretionssteigerung in der olfaktorischen Schleimhaut des Menschen nach adrenerger Stimulation hervorrufen (Chen, 1993).

5.3 Neuropeptiderge Innervation

Nach der Entdeckung des Neurotransmitters Substanz P (Euler und Gaddum, 1931) beginnt erst in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts mit der Isolierung weiterer neuropeptiderger Transmitter die sogenannte Peptidära (Ichimura, 1988; Burnstock, 1990). Die axonalen Transportmechanismen unterliegenden Neuropeptide sind mit den klassischen Neurotransmittern Azetylcholin und Noradrenalin bzw mit jeweils anderen Neuropeptiden in peripheren Nervenfasern kolokalisiert (Burnstock, 1990; Baraniuk, 1991). In cholinergen Nervenfasern wurde VIP und Peptid Histidin Methionin, in aminergen Neuronen Neuropeptid Y und in sensorischen Nerven CGRP, SP und Neurokinin A lokalisiert (Änggard, 1974; Barnes, 1987; Stjärne, 1989; Baraniuk, 1991). Auf Grund der vielseitigen Eigenschaften und der unterschiedlich stark ausgeprägten Verteilung in peripheren Nerven der Nasenschleimhaut stellen Neuropeptide bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt, wie zahlreiche aktuelle Publikationen zeigen (Uddman, 1999; Cervin, 1999; Malis, 1999), ein interessantes und noch nicht geklärtes Forschungsobjekt dar. Neuropeptide vollständig zeigen im Zusammenspiel mit den klassischen Neurotransmittern neuromodulatorische und neuroregulatorische Eigenschaften bei der Beeinflussung des nasalen Blutflusses, der glandulären Sekretion und bei Immunabwehrmechanismen (Payan, 1984; Barbes, 1987; Baraniuk, 1990; Hauser-Kronberger, 1994). Eine entscheidende Rolle bei pathophysiologischen Prozessen wie z.B. dem Asthma bronchiale (Barnes, 1984), allergischer (Fang, 1998) und vasomotorischer Rhinopathie (Ruffoli; 2000) wurde für einige Neuropeptide nachgewiesen. Die Neuropeptidwirkungen werden durch die neutrale Endopeptidase (NEP 24,11), die auch in seromukösen Drüsen nachgewiesen wurde, reguliert und limitiert (Gawin, 1993; Ohkubo, 1994). Die Dipeptidylaminopeptidase IV und das Angiotensin
Converting Enzym (ACE) beteiligen sich ebenfalls am Peptidabbau (Hauser-Kronberger, 1994). Die in den Drüsen produzierte NEP reguliert, vermutlich über die Wirkung auf Neuropeptide, auch die Drüsensekretion, während ACE als zirkulierendes Enzym vaskulären Ursprungs eher für die Kontrolle der Gefäßpermeabilität verantwortlich ist (Ohkubo, 1994).

Auf Grund des quantitativ geringen Vorkommens von Neuropeptiden in der Nasenschleimhaut, der kurzen Halbwertszeit sowie ubiquitär vorhandener, neuropeptidabbauender Enzyme ist der Nachweis nur schwierig zu führen und bedarf für jedes Neuropeptid der Erarbeitung spezieller immunhistochemischer Arbeitabläufe. Die Anwendung der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode erwies sich dabei als zuverlässige Detektionstechnik. Der Vorteil liegt hier in der Vermeidung falsch-positiver Befunde, wie sie z.B. durch Autofluoreszenz bei Immunfluoreszenztechniken auftreten können, und in der kontrastreichen Darstellung des umliegenden Gewebes.

5.3.1 VIP

Das aus 28 Aminosäuren bestehende vasointestinale Polypeptid wurde zuerst von Said und Mutt isoliert und von Uddman erstmals in Nerven der respiratorischen Nasenschleimhaut von Kaninchen, Katzen und Meerschweinchen dargestellt (Uddman, 1978; 1979). Nach Konzentrationsmessungen ist VIP das in der höchsten Konzentration auftretende relevante der Neuropeptid in entzündungsfreien Nasenschleimhaut (Baraniuk, 1990). Hauser-Kronberger konnte mittels Radioimmunoassay eine Konzentration von 4,96 µg/g Nassgewicht in der unteren Nasenmuschel feststellen (Hauser-Kronberger, 1993). VIP wurde in Azetylcholin-haltigen parasympathischen Nervenfasern identifiziert (Uddman, 1978; Lundberg, 1981). Durch zahlreiche immunfluoreszenzmikroskopische (Baraniuk, 1990; Stjärne, 1991) bzw. immunhistochemische Untersuchungen (Riederer/Knipping, 1995; Knipping, 2001) konnte VIP an Strukturen der Nasenschleimhaut verschiedener Säuger und des Menschen nachgewiesen werden. Wie auch von Laitinen in immunreaktiven Nerven des unteren Respirationstraktes des Menschen beobachtet, sich VIP-positive, zeigten immunelektronenmikroskopische Markierungen in "dense core vesicles" unterschiedlicher Größe (Laitinen, 1985). Die Markierung von VIP und der anderen hier untersuchten Neuropeptide in diesen kernhaltigen Vesikeln steht in Übereinstimmung mit den Beschreibungen von Hökfelt, der den peptidergen Ursprung dieser Neurovesikel nachweisen konnte (Hökfelt, 1980). Yokoyama beschrieb nach ultrastrukturellen Studien am Meerschweinchen das Vorkommen cholinerger und VIP-haltiger Nerven an seromukösen Drüsen (Yokoyama, 1991). Durch Agha-Mir-Salim und Riederer/ Knipping konnten VIP-Rezeptoren an den Drüsen der menschlichen Nasenschleimhaut identifiziert werden (Agha-Mir-Salim, 1991; Riederer, 1995). VIP liegt als Kotransmitter in cholinergen Nerven des Respirationstraktes verschiedener Spezies und des Menschen vor (Klaassen, 1988; Baraniuk, 1990; Stjärne, 1991; Hauser-Kronberger, 1993). Anhand verschiedener physiologischer Untersuchungen konnte der multifunktionelle Charakter von VIP belegt werden. Über eine langandauernde Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt sich VIP wesentlich an der Regulation des nasalen Blutflusses (Uddman, 1978; Malm, 1979; O'Dorisio, 1985; Barnes, 1987; Sundler, 1988; Lundberg, 1991).

Durch die hier vorliegenden immunhistochemischen und immunelektronenmikroskopischen Ergebnisse kann die Lokalisation dieses Neuropeptids morphologisch bestätigt und weiter konkretisiert werden. Wie schon von Baraniuk nach Silberimprägnations-Versuchen beschrieben, konnte VIP häufiger an Drüsen als an den Gefäßen des Schwellkörpers gefunden werden (Baraniuk, 1990; Knipping, 2001). Das Vorkommen von VIP-haltigen Axonen in direkter Umgebung von Azinuszellen und an Ausführungsgängen deutet auch auf eine unmittelbare Beeinflussung der Sekretionsproduktion und der Transportvorgänge des Drüsensekrets hin. Der deutliche Nachweis von VIP durch den Einsatz spezifischer Antikörper in periglandulären und periduktalen Nervenfasern bestätigt auf morphologischer Ebene die VIP zugesprochene Rolle als Neuromodulator in cholinergen Nerven. Hier wird durch VIP eine Sekretionssteigerung der Drüsen hervorgerufen, möglicherweise über eine Stimulation des Chloridionentransports, wie er auch in intestinalen (Baraniuk, 1990; O'Dorisio, 1985) und bronchialen (Barnes, 1987) Drüsen nachgewiesen wurde. Durch Aktivierung der Adenylatzyklase besonders an mukösen Drüsenzellen der Lunge soll VIP eine glykoproteinreiche Sekretion stimulieren (Barnes, 1987). VIP vermittelt im Pancreas Sekretionsreize für Wasser, Bikarbonat und Enzyme (Baraniuk, 1990; O'Dorisio, 1985), ein Sekretionsmechanismus, der auch im Ausführungsgangsystem der nasalen Drüsen eine Rolle spielen könnte.

Außerdem besitzt VIP epithelschützende, antioxidative Eigenschaften und beteiligt sich über eine Adenylatzyklaseaktivierung an der Regulation der Lymphozytenproduktion und führt zur Inhibition der Antikörperund Leukotrienproduktion (O'Dorisio, 1985; Lundberg, 1991). VIP kann die Freisetzung von Interleukinen (IL-6 und IL-8) stimulieren und damit proinflammatorische Effekte wie die Aktivierung von Leukozyten und Lymphozyten auslösen. Damit scheint VIP auch eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale und weiterer Atemwegsentzündungen zu spielen (Mullol, 1997).

5.3.2 CGRP

Der in nozizeptiv-sensomotorischen Neuronen lokalisierte Neurotransmitter CGRP besteht aus 37 Aminosäuren. Die von Rosenfeld 1983 entdeckte und von Uddman (1985) erstmals im Atemtrakt beschriebene alpha-Form findet sich in sensorischen, die beta-Form in intestinalen Nerven (Alving, 1990; Baraniuk, 1990). CGRP moduliert sensorische Reize in Kotransmission mit SP (Barnes, 1987; Stjärne, 1989; Zaidi, 1990) in afferenten sensomotorischen Nerven und stellt ein wichtiges Bindeglied im Axonreflex und bei der sogenannten "neurogenen Entzündung" dar (Wolf, 1988; Stjärne, 1989). CGRP gilt als langanhaltender und potenter Vasodilatator im Menschen (Zaidi, 1990). CGRP wird von neuroendokrinen Zellen der Tracheobronchialschleimhaut bei allergischen Reaktionen freigesetzt und kann zu einer Bronchokonstriktion beitragen (Palmer, 1987; Baraniuk, 1990). CGRP führt zur Anregung der Lymphozytenproliferation (Lundberg, 1991). Durch in vivo-Experimente mit CGRP an der Nasenschleimhaut der Katze und am Meerschweinchen konnten Stjärne und Gawin nach CGRP-Applikation eine Erhöhung der Plasmaproteinexsudation und eine Erhöhung der glandulären Sekretion festgestellen (Stjärne, 1991; Gawin, 1993). Dabei wird die SP-induzierte Plasmaextravasation durch CGRP verstärkt (Uddman, 1983, Brokaw; 1992). CGRP liegt im Vergleich mit anderen Neuropeptiden nur in sehr geringer Konzentration in der respiratorischen Schleimhaut des Menschen vor (Baraniuk, 1990).

Neben der Lokalisation in periarteriellen Nervenfasern (Riederer/Knipping, 1995; Knipping, 2001) konnte CGRP in Form feiner Varikositäten in Nervenbündeln und in periglandulären Nerven, die nur vereinzelt Kontakt zu den Azinuszellen zeigten, gefunden werden. Eine besonders intensive Verteilung CGRP-haltiger Fasern wurde im subepithelialen Bindegewebe und an den beobachtet. In Bestätigung Drüsenausführungsgängen der Immunfluoreszenzversuche von Hauser-Kronberger (1994) und von anderen Forschungsgruppen (Uddman, 1983; Stjärne, 1991) konnte Substanz P kolokalisiert in subepithelialen Nervenfasern nachgewiesen werden. Immunelektronenmikroskopisch konnte CGRP, wie durch Feher (1986) im Intestinum und durch Gulbenkian (1986) im Ganglion trigeminale des Meerschweins, in "dense core vesicles" markiert werden. Insbesondere scheint CGRP als Mediator in sensiblen Nervenfasern im Subepithel und im periglandulären Bindegewebe im Zusammenhang mit der Rezeption, Modulation und Transmission nozizeptiver Reize eine Rolle zu spielen (Zaidi, 1990). Durch verschiedene chemische, thermische und taktile Reize kann über einen zentralantidrom-efferenten afferenten und Impuls bzw. über Aktivierung parasympathischer Reflexe eine Sekretionsstimulation der Drüsen und die Freisetzung schleimhautprotektiver Proteine wie Laktoferrin und Lysozym sowie von Immunglobulinen auslöst werden (Baraniuk, 1990; Bernstein, 1991). Lacroix konnte nach Capsaicinbehandlungen von Patienten mit nichtallergischer Rhinitis eine Beteiligung von CGRP an der mukoiden Sekretion belegen (Lacroix, 1992). Die durch Immunfluoreszenztechniken von Stjärne (1991) am Schwein und von Hauser-Kronberger (1993) am Menschen aufgezeigten intraepithelialen peptidergen Neurone konnten in dieser Studie weder durch neurogene Marker immunhistochemisch noch durch immunelektronenmikroskopische Techniken nachgewiesen werden.

Eine indirekte Wirkung von CGRP auf die Drüsenfunktionen ist auch über Regulation und Modulation der periglandulären Durchblutung an arteriellen Gefäßen zu vermuten.

CGRP kann an der Ausbildung eines durch arterielle Gefäßerweiterung ausgelösten neurogenen Ödems im Rahmen einer vasomotorischen Rhinopathie beteiligt sein (Barnes, 1987; Wolf, 1988; Lundberg, 1991; Stjärne, 1991).

5.3.3 SP

Das aus 11 Aminosäuren zusammengesetzte sensorische Neuropeptid Substanz P wurde erstmals von Euler (1931) aus Gehirn und Dünndarm des Schweins isoliert und von Hökfelt (1975) in sensorischen Nerven nachgewiesen. SP vermittelt seine Wirkungen an den Erfolgsorganen über spezifische NK₁-Rezeptoren (Stjärne, 1989). Durch vorwiegend im Epithel lokalisierte abbauende Endopeptidasen, die Dipeptidylaminopeptidase IV und das Angiotensin Converting Enzym werden die SP-Wirkungen limitiert (Ohkubo, 1994). SP liegt, im Vergleich mit anderen Neuropeptiden, in nur geringen Mengen in der menschlichen Nasenschleimhaut vor (Albegger, 1991). In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Konzentration von SP (Wolf, 1987; Albegger, 1991; Baraniuk, 1991; Woodhead, 1994). Für die altersabhängigen Konzentrationsangaben zeigte sich eine Beeinflussung durch chronische Rhinitiden und Rauchen (Barnes, 1987; Wolf, 1987). SP, zur Gruppe der Tachykinine gehörend, führt zu einer schnell einsetzenden und kurz anhaltenden, atropinresistenten Vasodilatation mit anschließender Zunahme der Durchblutung und der Gefäßdurchlässigkeit (Lundblad, 1983; Ichimura, 1988; Stjärne, 1991). SP konnte in sensorischen Nerven der Nasenschleimhaut verschiedener Säugetiere, kolokalisiert mit CGRP, markiert werden (Änggard, 1983; Uddman, 1983; Lundberg, 1984; Baraniuk, 1991). Tonnesen konnte nach Serotoninstimulation gesunden an Nasenschleimhäuten eine erhöhte SP- Konzentration feststellen und durch Vergleich mit SP-Serumwerten den Ursprung der SP-Ausschüttung in sensorischen Nerven nachweisen (Tonnesen, 1987; 1988). Auch SP kann bei der Entwicklung eines "neurogenen Ödems" mit einer konsekutiven Zunahme des Nasenatmungswiderstandes beteiligt sein (Wolf, 1988). Die chemisch (z.B. Capsaicin) oder mechanisch induzierte SP-Freisetzung aus sensorischen Nervenfasern führt zur orthodromen Erregung afferenter Neurone, die über trigeminale Leitungsbahnen vegetative Zentren erreichen oder über lokale Axonreflexe die SP-Wirkungen am Gefäßsystem oder den Drüsen vermitteln (Barnes, 1987; Wolf, 1987; Stjärne, 1989; 1991). Durch wiederholte Gaben von Capsaicin, einem Alkaloid (Methyl-N-Vanillyl-Nonenamid) aus scharfen Pfefferund Paprikaschoten, kommt es zur Desensibilisierung von Nozizeptoren, zur Degeneration der afferenten C-Fasern und zur Depletion von SP (Wolf, 1987; Stjärne, 1991). Damit steht ein suffizienter Therapieansatz für hyperreflektorische Rhinopathien zur Verfügung (Stjärne, 1991; Lacroix, 1992; Wolf, 1995). SP werden auch immunmodulatorische Eigenschaften durch chemotaktische Wirkungen auf Leukozyten und Lymphozyten zugesprochen (McGillis, 1987).

Spezifische SP-Rezeptoren konnten auf Lymphozyten und Mastzellen gefunden werden (Änggard, 1993). Der hier vorliegende immunelektronenmikroskopische Nachweis von SP-haltigen Nervenfasern in unmittelbarer Nähe bzw. Kontakt zu Mast- und Plasmazellen belegt ultrastrukturell die immunmodulatorischen Funktionen von SP. An den Drüsen der Nasenschleimhaut von Ratten konnte Kamijo (1993) bei videomikroskopischen Untersuchungen eine SP-induzierte Sekretionssteigerung mit erhöhter Exozytose und Schrumpfung der Azinuszellen demonstrieren. In der Nasenschleimhaut von Säugern (Änggard, 1983; Uddman, 1983; Lundberg, 1984) und des Menschen (Uddman, 1983; Baraniuk, 1991; Hauser-Kronberger, 1993) konnte SP durch Immunfluoreszenztechniken an Venen, venösen Sinusoiden und Arteriolen nachgewiesen werden. Die eindeutige Zuordnung von immunreaktiven Strukturen kann jedoch durch die starke Autofluoreszenz von Epithel und elastischen Fasern stark beeinträchtigt sein 1983). (Laitinen. Bei den hier vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sich SP-haltige Nervenfasern neben CGRPimmunreaktiven Nerven besonders in der Adventitia von Arterien und Arteriolen, in der subepithelialen Region und an den Azinuszellen. Während Jeon (1993) in der Meerschweinchenmukosa eine wesentlich intensivere SP-Markierung erreichte, zeigten sich bei den hier vorliegenden Untersuchungen am Menschen nur dezente Markierungen. Diese Unterschiede im Färbe- und Nachweisverhalten weisen auf die erwähnten Speziesunterschiede hin. Durch immunelektronenmikroskopische Versuche konnte die Lokalisation von SP bestätigt werden. Identisch mit den immunelektronenmikroskopischen Befunden von Rha (1994) an der Katze wurde SP im Axoplasma und in "dense core vesicles" nachgewiesen. Über die Aufnahme von Reizen im subepithelialen Bereich scheint eine direkte Verbindung von sensorischen Nervenfasern zu den seromukösen Drüsen zu bestehen. Von Stjärne (1991) konnte die Auslösung von Symptomen einer allergischen Rhinopathie durch SP-Applikation gezeigt werden. Im Rahmen einer nasalen Allergie kann durch SP-Ausschüttung an sensorischen Neuronen eine Sekretionssteigerung an den Drüsen hervorgerufen werden. Diese Vermutung wird auch durch ELISA-Untersuchungen von Chaen (1993) gestützt, bei denen eine Erhöhung von SP im Nasensekret von Allergikern festgestellt wurde.

5.3.4 NPY

Das aus 36 Aminosäuren aufgebaute Neuropeptid Y (NPY), auch Neuropeptid Tyrosin genannt, wurde erstmals im Schweinehirn nachgewiesen und ist mit Noradrenalin in sympathischen Nervenfasern der Nasenschleimhaut kolokalisiert (Lundberg, 1982; Baraniuk, 1990; Hauser-Kronberger, 1994). Bei quantitativen Untersuchungen mittels Radioimmunoassay konnten sowohl von Hauser-Kronberger und Mitarbeitern als auch von Fang hohe Konzentrationen von NPY (ca.3,29µg/g Nassgewicht) in der unteren Nasenmuschel des Menschen gemessen werden (Hauser-Kronberger, 1994; Fang, 1998). Damit kann NPY zu den prädominanten Neuropeptiden der oberen Atemwege gezählt werden (Uddman, 1999). Die durch NPY an postsynaptischen Y₁-Rezeptoren (Nielsson, 1996; Uddman, 1999) der arteriellen Gefäße ausgelöste potente, langanhaltende Vasokonstriktion und Verstärkung der postganglionären Noradrenalinwirkung wurde durch in vivo- und in vitro- Versuche von Lacroix (1990), Hauser-Kronberger (1994) und Cervin (1999) belegt. Neuropeptid Y wurde mittels verschiedener Verfahren wie Radioimmunoassay, Immunfluoreszenz und Immungoldintensivierung in der Nasenschleimhaut von zahlreichen Spezies und des Menschen nachgewiesen (Baraniuk, 1990; Albegger, 1991; Amores, 1991; Hauser-Kronberger, 1994; Fang, 1998; Uddman, 1999). Dabei konnte eine Prädominanz dieses langwirksamen Vasokonstriktors im Bereich der arteriellen Gefäße und an arteriovenösen Anastomosen festgestellt werden. An den seromukösen Drüsen wurden keine oder nur vereinzelt NPY-haltige Nervenfasern gefunden (Baraniuk, 1992). Insbesondere im Bereich der Drüsen differieren die Befunde der Tierversuche im Vergleich zu Untersuchungen der menschlichen Nasenschleimhaut. Baraniuk (1992) konnte keinen Effekt von intranasal appliziertem NPY auf die Zusammensetzung und Menge der Drüsensekretion nachweisen. Im Tierversuch wurden bei verschiedenen Spezies (Schwein, Meerschweinchen, Ratte, Frettchen) NPY-haltige Nerven in der Umgebung von Drüsen und zum Teil an Myoepithelzellen beschrieben (Yokoyama, 1991; Baraniuk, 1992; Zhao, 1998) und deutliche Unterschiede in der NPY-Rezeptordichte festgestellt (Lacroix, 1990; Baraniuk, 1992). Zusätzlich wurde ein NPY-vermittelter Effekt auf die Lysozymproduktion und das Drüsensekretionsvolumen gemessen. Hauser-Kronberger konnte mit der Immunfluoreszenzmethodik sowohl in der Nasenschleimhaut als auch im Larynx des Menschen NPY-immunreaktive Fasern assoziiert mit Drüsenstrukturen finden (Hauser-Kronberger, 1993: 1994). Durch die hier vorliegenden immunhistochemischen und immunelektronenmikroskopischen Befunde konnten NPY-immunreaktive Nervenfasern noch genauer anatomischen Strukturen der Nasenschleimhaut zugeordnet werden. Somit lässt sich der bekannte langanhaltende, vasokonstriktorische Effekt von NPY an arteriellen Gefäßen der Nasenschleimhaut morphologisch untermauern. Die Darstellung NPY-haltiger Nervenfasern in Kontakt zu den Azinuszellen lässt eine Modulation der sympathischen Regulation der Drüsenfunktionen durch die kolokalisierten Neurotransmitter Noradrenalin und NPY vermuten. Das in "dense core vesicles" vorkommende NPY scheint den hemmenden Einfluss von sympathischen Nervenimpulsen auf die Drüsensekretion zu regulieren. Da NPY auch die präjunktionalen Rezeptoren (Lacroix, 1996) und die postganglionäre cholinerge Übertragung (Baraniuk, 1992) blockieren kann, muß eine indirekt hemmende (anticholinerge) Wirkung für die Drüsensekretion angenommen werden. Yokoyama konnte im Bereich der Drüsenausführungsgänge des NPY-immunreaktive Fasern Meerschweinchens im Elektronenmikroskop darstellen (Yokoyama, 1991). Das durch die hier vorliegenden Versuche bestätigte Vorkommen von NPY-haltigen Nervenfasern im Bindegewebe um die Ausführungsgänge der menschlichen Nasenschleimhaut lässt die Vermutung zu, daß hier eine Beeinflussung von Transport- und Sekretionsvorgängen durch NPY Ein Kontakt stattfinden kann. von NPY-haltigen Nervenfasern zu Myoepithelzellen, wie von Yokoyama (1991) beschrieben, konnte jedoch nicht gefunden werden. Auch bei den Untersuchungen zur Gesamtinnervation konnten weder licht- noch elektronenmikroskopisch Axone an Myoepithelzellen identifiziert werden. Eine Kolokalisation von NPY in VIP-haltigen perivaskulären Nerven, wie sie von Lacroix (1990) beim Schwein festgestellt wurde, kann nach den hier vorliegenden Befunden in der Nasenschleimhaut des Menschen nicht angenommen werden.

5.4 Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO)

Von Bredt stammen erste Hinweise auf die Rolle von Stickstoffmonoxid als Neurotransmitter (Bredt, 1990). Stickstoffmonoxid (NO) wurde neben Azetylcholin als nicht-adrenerger-nicht-cholinerger (NANC)-Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem als Kotransmitter in parasympathischen Nervenfasern nachgewiesen und kann cholinerge Wirkungen am Gefäßsystem und den Drüsen modulieren (Riederer, 1996; Jeon, 1997; Tasman, 1998). Hanazawa (1997), Jeon (1997) und Kondo (2000) konnten bei histochemischen Versuchen zum Nachweis von Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-Diaphorase (NADPH-d), einem wesentlichen Enzym der NO-Synthese, am Meerschweinchen, der Ratte bzw. am Menschen das Ganglion pterygopalatinum als Ursprung der nitrergen Innervation bestimmen, während Tasman (1998) auf einen sympathischen, parasympathischen und sensorischen Ursprung hinwies. Die von NO induzierte Vasodilatation durch Relaxation der Gefäßmuskulatur scheint zusätzlich auch durch endothelial gebildetes NO ausgelöst zu werden (Palmer, 1987). Darüber hinaus werden NO zahlreiche physiologische Eigenschaften zugeschrieben. Immunologische Wirkungen durch Beeinflussung der Makrophagenaktivität sowie antivirale und antibakterielle Eigenschaften wurden nachgewiesen (Tasman, 1998; Riederer, 1999). In den Nasennebenhöhlen wurden bakteriostatische Konzentrationen von NO bei gesunden Personen gemessen (Lundberg, 1995; Kawamoto, 1998). Die Schlagfrequenz des respiratorischen Flimmerepithels kann durch NO moduliert werden (Ueda, 2001).

Auf Grund der kurzen NO-Halbwertzeit (ca.0,6 Sekunden) kann kein direkter Nachweis im Gewebe durchgeführt werden (Heß, 2000). Die für die Katalysierung zuständigen NO-Synthasen (NOS) lassen sich jedoch aus verschiedenen Geweben isolieren und stehen für den NO-Nachweis zur Verfügung. Bisher konnten drei verschiedene Isoenzyme der Synthase kloniert werden: die von einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel abhängige nNOS (NOS I) in Nerven und eNOS (NOS III) im Endothel sowie die kalziumunabhängige, durch Zytokine und Bakterienlipopolysaccharide induzierbare iNOS (NOS II) (Schmidt, 1992; Heinrich, 1998; Heß, 1998; Tasman, 1998; Riederer, 1999; Kang, 2000). Derzeit wird davon ausgegangen, das es keinen spezifischen NO-Rezeptor gibt. NO diffundiert in die Zielzellen, aktiviert dort die lösliche Guanylzyklase und führt zu einem cGMP-Anstieg (Garthwaite, 1991; Tasman, 1998). Hierdurch werden Proteinsynthesemechanismen in der Zelle reguliert und die NO-Wirkungen, z.B. die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt. Die endotheliale NOS scheint einen wesentlichen Einfluß auf die basalen Regulationsmechanismen der Gefäße auszuüben (Heß, 2000). Die durch Entzündungsabläufe induzierbare iNOS bestimmt im wesentlichen die messbare NO-Menge in den Nasennebenhöhlen.

Ruffoli führte ultrastrukturelle Untersuchungen zur vasomotorischen Rhinitis mit einer histochemischen Methode zur Bestimmung von NADPH-d durch (Ruffoli, 2000). NADPH-d- Färbungen können jedoch auch durch andere Enzyme verursacht werden und sollten durch spezifische immunhistochemische Techniken, wie die Markierung der NOS, bestätigt werden (Jeon, 1997; Heinrich, 1998; Riederer, 1999).

Neben dem Nachweis von endothelialer NOS in Gewebeproben verschiedener Körperregionen von Mensch und Rind (Pollock, 1993) und von NOS im Atemtrakt des Meerschweinchens (Fischer, 1993; Kondo, 2000) sowie der Ratte (Kulkarni, 1994) wurden durch histochemische und immunhistochemische Methoden nitrerge Strukturen der Nasenschleimhaut des Menschen dargestellt (Riederer, 1996; Hanazawa, 1997; Jeon, 1997; Kawamoto, 1998; Tasman, 1998; Heß, 2000). Mittels des histochemischen Verfahrens nach Vincent und Kimura zur Markierung der Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-Diaphorase (NADPH-d) konnten Riederer und Heß NO im Gefäßendothel und dem Epithel der menschlichen Nasenschleimhaut darstellen (Riederer, 1996; Heß, 2000). Durch den gleichzeitigen, hier erbrachten histochemischen Nachweis der NADPH-Diaphorase und der Azetylcholinesterase in Nerven um die seromukösen Drüsen konnte die Kolokalisation beider Enzyme und damit die nitrerg-cholinerge Koinnervation der Drüsen belegt werden. In den dargestellten nitrerg-cholinergen Nerven überwog der Anteil der cholinergen Nervenfasern. NO scheint bei der Regulation der Drüsen den sekretionsfördernden cholinergen Einfluß zu verstärken. Durch die immunelektronenmikroskopischen Befunde können die oben beschriebenen Lokalisationen von NO in der entzündungsfreien Nasenschleimhaut ultrastrukturell bestätigt werden. Es ergeben sich jedoch auch neue Aspekte. NO scheint in der Nasenschleimhaut inhomogen lokalisiert zu sein. So konnten Bezirke mit einer hohen NO-Akkumulation und damit verbundener NO-Abhängigkeit mit Regionen ohne NO-Nachweis gefunden werden. Vergleichbar mit den ultrastrukturellen Ergebnissen von Heinrich und Maurer am Cortiorgan des Meerschweinchens zeigen sich in der Nasenschleimhaut des Menschen starke NOS-Immunreaktionen im Zytoplasma von Endothelzellen (Heinrich, 1997). Auffällig war die NO-Akkumulation in Endothelzellen von Kapillaren und arteriellen Gefäßen, während die Venen und venösen Sinusoide keine NOS-Immunreaktivität aufwiesen.

histochemische Methoden konnte (1997)Durch Hanazawa in der Nasenschleimhaut der Ratte und des Menschen NO-haltige Nervenfasern um seromuköse Drüsen nachweisen. Die NOS-Immunreaktivität in den nicht myelinisierten periglandulären und periarteriellen Nerven war in den hier durchgeführten Versuchen wesentlich stärker ausgeprägt als bei den Versuchen von Heinrich am Meerschweinchen (Heinrich, 1997). Möglicherweise sind die verschiedenartigen Fixierungs- und Einbettungsmethoden bzw. artspezifische Unterschiede dafür verantwortlich. Durch den immunelektronenmikroskopischen Nachweis von NOS I im Nervengeflecht der seromukösen Drüsen und der arteriellen Gefäße kann von einer direkten nervalen Koregulation und Modulation durch NO ausgegangen werden. Eine besonders intensive Beeinflussung der Sekretion scheint auf Grund der starken Immunreaktivität in periglandulären und periductalen Axonen sowie im Zytoplasma der Azinuszellen unter physiologischen Bedingungen vorzuliegen (Jeon, 1997; Kawamoto, 1998). Kang konnte bei Patienten mit Rhinitis allergica eine starke Akkumulation der induzierbaren NOS in den Drüsen finden und damit die Rolle von NO bei entzündlichen, hypersekretorischen Prozessen der Nasenschleimhaut belegen (Kang, 2000). Kawamoto fand mittels histochemischen und immunhistochemischer Methoden eNOS gleichverteilt in periglandulären Nerven von Patienten mit Rhinitis allergica als auch bei nicht entzündlich veränderter Nasenschleimhaut vor, während eNOS und iNOS im Epithel der Allergiker stärker auftrat. Nach Zytokin-Stimulation scheint die induzierbare NOS über erhöhte NO-Produktion erheblich an den Symptomen der allergischen Rhinitis beteiligt zu sein (Kawamoto, 1998).

5.5 Einfluss der Gefäßversorgung auf die Drüsen

Bei den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Drüsenregion der unteren Nasenmuschel konnte ein dichtes Gefäßnetz gefunden werden. Neben den teilweise sehr drüsennah gelegenen Arteriolen zeigten sich zahlreiche periglanduläre Kapillaren. Bei Betrachtung im Elektronenmikroskop fallen besonders die Fenestrationen der Kapillaren auf, die durch dünne Membranen verschlossen und den Düsenzellen zugewandt sind. Diese fenestrierten Kapillaren konnten auch im subepithelialen Bindegewebe beobachtet werden. Durch nervale Regulation des Blutvolumens und des Blutflusses an den vorgeschalteten Arteriolen und den postkapillären Polstervenen kann eine konsekutive Beeinflussung der glandulären Blutversorgung erfolgen. Schon Cauna (1970) vermutete einen Einfluß der vegetativen Innervation der Gefäße auf die Drüsen der Nasenschleimhaut. Über parasympathische Axone sowie VIP-, CGRP- und NOhaltige Nervenfasern kann es nach arterieller Vasodilatation zur Dilatation der periglandulären Kapillaren kommen. Zusätzlich scheint VIP auch über eine Aufnahme aus dem Blut an die Gefäßmuskulatur der Arteriolen zu gelangen und seine vasodilatatorische Wirkung zu entfalten (Barnes, 1987; Riederer/ Knipping, 1995). Durch die o.g. Neurotransmitter kann eine vermehrte Blutzufuhr an den Drüsen und damit eine Steigerung der Drüsensekretion angenommen werden.

Ultrastrukturell konnten dichte NOS-immunreaktive Bezirke in lumennahen Regionen des Endothels aufgezeigt werden. Das im Zytoplasma produzierte Stickstoffmonoxid, von Palmer 1987 auch als "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF) bezeichnet, dringt über Diffusion in den Zellkern ein und kann hier über cGMP-Wirkung Proteinkinasen aktivieren und damit eine Relaxation der glatten Muskelzellen bewirken (Brown, 1993). Stickstoffmonoxid beteiligt sich hier auch an der physiologischen Regulation des periglandulären Blutflusses.

Auf Grund des ultrastrukturellen Nachweises von NO in perivaskulären Nerven und im Endothel muß geschlossen werden, dass dem vasodilatatorisch wirkenden Stickoxid eine duale Beeinflussung des Gefäßtonus zugesprochen werden kann. Neben der Modulation des arteriellen Vasotonus ist auch eine relaxierende Wirkung im Bereich der kapillären Perizyten anzunehmen. Der erhöhte präarterielle und postkapilläre Druck kann zur Dilatation der Kapillarwandung und zusätzlich nach Relaxation der Perizyten zur Öffnung der kapillären Fenestrationen führen. Es kommt konsekutiv zur erhöhten Plasmaextravasation und konsekutiv zu einem vermehrten Angebot von Serumbestandteilen für die seromukösen Drüsen. Neben der Wirkung als Neuromodulator in drüsennahen Nerven scheint NO somit auch über die Regulation des periglandulären Blutflusses die Funktionen der Drüsen zu beeinflussen.

Die in direkter Umgebung zu den seromukösen Drüsen nachgewiesenen, durch zahlreiche Noradrenalin- und NPY-haltige Nerven versorgten Arteriolen scheinen ebenfalls eine indirekte Regulation der Durchblutung des periglandulären Bindegewebes und damit der Drüsenversorgung zu bewirken. Der Blutfluß und das Blutvolumen in den nachgeschalteten, die Drüsen versorgenden fenestrierten Kapillaren kann durch NPY-vermittelte Vasokonstriktion vermindert und dadurch der Antransport von Substraten für die Sekretbildung reduziert werden.

5.6 Morphologische Veränderungen und Neurotransmitterverteilung bei verschiedenen Rhinopathien

5.6.1 Zystische Fibrose

Die Mukoviszidose oder Zystische Fibrose (CF) ist eine autosomal-rezessive Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:2000 Neugeborenen und damit eine der häufigsten Erberkrankungen in Europa (Drake-Lee, 1989; Irving, 1997). Ursächlich liegt ein Defekt des "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator proteine" durch Mutation der Region q31 auf Chromosom 7 vor (Hui, 1995; Irving, 1997). Die Patienten leiden unter chronisch-rezidivierenden Sinusitiden, Polyposis nasi und Nasenatmungsbehinderungen durch Muschelhyperplasien (Crockett, 1987; Hui, 1995).

In den hier vorliegenden Untersuchungen konnten zahlreiche pathologische Veränderungen der Nasenschleimhaut bei der Zystischen Fibrose (CF) aufgezeigt werden (Knipping, 2002). Die zähe Sekretion beruht auf einem gestörten Elektrolyttransport. Durch zusätzliche Infekte kommt es zur weiteren Epithelschädigung. Morphologisch zeigt sich ein insuffizientes, zum Teil nicht zilientragendes Epithel als Ursache für einen eingeschränkten mukoziliaren Transport. Sekundäre Zilienfehlbildungen sind bei der CF ebenfalls zu finden (Markmann, 1990). Der typische mehrreihige Aufbau des Epithels aus Flimmerzellen, Becherzellen und Basalzellen ist gestört. Zusätzlich kann eine exogen-toxische Beeinflussung der Zilien durch bakterielle Besiedlung angenommen werden (Deitmer, 1992; Hui, 1995). Des Weiteren finden sich, im Gegensatz zu den Drüsen der normalen Nasenschleimaut, pathologisch veränderte seromuköse Drüsen, die einen überwiegend mukösen Anteil aufweisen. Sie stellen das morphologische Korrelat für das bei der CF typische zähe, hochvisköse Sekret dar. Die Exkretion scheint ebenfalls gestört zu sein, was sich an den stark dilatierten Drüsenlumina und einem auffällig mukösen Sekret zeigt. Der Hinweis, dass zystisch-dilatative Veränderungen der Drüsen eine typische morphologische Besonderheit bei der CF darstellen, findet sich schon bei Schwachman (1962).

Elektronenmikroskopisch waren überwiegend aufgelockerte Granula in den übermäßig gefüllten Azinuszellen zu finden. Dieser Befund deutet auf ein Überwiegen muköser Drüsen hin (Jahnke, 1998). Die vermehrt produzierte hochvisköse Schleimdecke behindert auch mechanisch den mukoziliaren Transport (Jahnke, 1977). Die erweiterten Drüsenkonglomerate könnten den venösen Blutabfluß behindern und konsekutiv zu einem extrazellulären Schleimhautödem führen (Rulon, 1963; Tos, 1977; Hui, 1995). Im Gegensatz zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen von Tos (1977) mittels PAS-Färbungen an Polypen von CF-Patienten konnten in der hier durchgeführten Studie im Bereich der unteren Nasenmuschel ausgedehnte Drüsenregionen gefunden werden. Vermutlich kommt es zusätzlich durch permanente Entzündungsreize zur Aktivierung des Endothels in den Kapillaren und zum vermehrten Durchtritt von Serumbestandteilen in das umliegende Gewebe. Die von Jahnke und Theopold (1977) beschriebenen Laminationen der kapillären Basalmembranen wurden bei den hier untersuchten CF-Patienten nicht häufiger als bei anderen Proben von entzündlich-veränderter Nasenschleimhaut gefunden und so als unspezifisch eingeordnet. Die im Epithelbereich nachgewiesenen Metaplasien mit stratifiziertem Plattenepithel können zu Defekten des fehlgeschichteten Epithels führen und somit den Prolaps der Schleimhaut mit der Entwicklung von Polypen bedingen. Die erhöhte Flüssigkeitsabsorption, verursacht durch eine Störung des Chloridtransportes, kann ebenfalls zur Entstehung von Polypen beitragen (Irving, 1997). Als ultrastrukturelles Korrelat für die gesteigerte Drüsensekretion wurden Zellkerne mit aufgelockertem Chromatin umgeben von zahlreichen Mitochondrien gefunden. Als Zeichen einer erhöhten Stimulierung der Drüsenzellen konnten, wie bereits von Jahnke und Theopold (1977) beschrieben, deutlich entwickelte Golgi-Felder und ein erweitertes rauhes endoplasmatisches Retikulum dargestellt die Proteinbiosynthese zuständig sind. werden, welche für In der Nasenschleimhaut von CF-Patienten konnten im Vergleich zur normalen Nasenschleimhaut keine Unterschiede im Innervationsmuster oder in der Verteilung der Neurotransmitter festgestellt werden.

Die aufgezeigten ultrastrukturellen Veränderungen der Nasenschleimhaut bei CF unterscheiden sich auch von der allergischen Rhinitis. Eine Infiltration mit eosinophilen Leukozyten konnte hier, ebenso wie von Jahnke (1977) und Crockett (1987) beschrieben, nicht gefunden werden. Allergien scheinen für die Pathogenese der CF keine Bedeutung zu haben (Crockett, 1987; Hui, 1995).

5.6.2 Allergische Rhinopathie

Die Rhinitis allergica ist die häufigste allergische Erkrankung bei Erwachsenen in Deutschland (Hermann-Kunz, 2001). In Mitteleuropa findet sich eine Prävalenz von 15% bis 25% mit voraussichtlich steigender Tendenz in den nächsten Jahren (Bachert, 1996; Heppt, 1997; Riechelmann, 1998; Turner, 1999). Die aus dem Formenkreis der Atopie stammende Erkrankung mit saisonaler und perennialer Verlaufsform führt bei den betroffenen Patienten zu Symptomen wie wässrige Rhinorrhoe, nasale Obstruktion, Juck- und Niesreiz und damit zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität (Petersson, 1988; Riechelmann, 1998; Corey, 2000). Ursächlich liegt eine spezifische, IgE-vermittelte Hyperreaktivität der Nasenschleimhaut zu Grunde.

Schon 1983 hatte Ishibe bei RIA-Untersuchungen an allergischen Nasenschleimhäuten des Menschen Veränderungen der Verteilung von Rezeptoren des autonomen Nervensystems gefunden und eine Beeinflussung durch nervale Mechanismen vermutet (Ishibe, 1983).

Bei Patienten mit perennialer allergischer Hyperreaktivität konnte im Bereich des durch chronische Entzündungszustände geschädigten Epithels eine dichte Infiltration mit lymphoiden Zellen gefunden werden. Während von Bentley (1992) und Varney (1992) bei der saisonalen Rhinitis allergica eine ausgeprägte Eosinophilie beschriebenen wurde, war bei Patienten mit perennialer Rhinitis nur eine mäßige Infiltration der Lamina propria mucosae mit eosinophilen Leukozyten elektronenmikroskopisch zu beobachten. Über Epithellücken kann, wie schon von Jahnke (1986) vermutet, ein schneller Kontakt zwischen Antigenen und immunkompetenten Zellen stattfinden. Die auffällig dilatierten Kapillaren stellen zum Einen das morphologische Korrelat für die nasale Hypersekretion dar. Über die zahlreichen Fenestrationen der Kapillarwände ist eine schnelle Passage und Extravasation von Serumbestandteilen und Entzündungszellen, die sich im perikapillären Gewebe finden lassen und über Cytokin-Interaktionen (z.B. Interleukin Il-3 und Il-5) kommunizieren, gewährleistet (Jahnke, 1983). Darüber hinaus wird SP eine Beeinflussung der Cytokinproduktion, vermutlich über die Stimulation von T-Lymphozyten, zugesprochen (Woodhead, 1994). Cytokine induzieren zusätzlich auch die NO Synthase und führen zur vermehrten NO-Produktion mit konsekutiver Vasodilatation und Ödembildung mit einer Verstärkung der allergischen Symptome (Sato, 1998). Zusätzlich begünstigen die hoch aktivierten und geschädigten Endothelzellen den schnellen extravasalen Flüssigkeitsaustritt. Die dargestellten konzentrischen Proliferationen der Perizyten belegen den chronischen Entzündungzustand.

Die Hypersekretion wird zum Zweiten durch die aktivierten seromukösen Drüsen und epithelialen Becherzellen bedingt. Der morphologische Nachweis hyperplastischer Drüsenzellen mit reichlich Mitochondrien und einem hochentwickelten endoplasmatischen Retikulum belegen die Beteiligung der Drüsen an der wässrigen Hypersekretion (Elwany, 1987). In Übereinstimmung mit Tos konnte eine Zunahme der Drüsenkomplexe beobachtet werden (Tos, 1977). Die Mast- und Plasmazellen können bei der chronischen perennialen Allergie in unterschiedlichen Aktivierungszuständen beobachtet werden. Die hier gefundenen Mastzellen zeigten den typischen morphologischen Aufbau, wie er auch von Knöbber (1993) beschrieben wurde. Das aus Mastzellen stammende Histamin sowie Bradykinine, Prostaglandine und Leukotriene verursachen über Reizung der sensorischen (SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern) und parasympathischen Nervenendigungen eine Aktivierung der zentralen, vasomotorischen und sekretorischen Zentren, die zu den klassischen Symptomen wie Hypersekretion, Nasenatmungsbehinderung, Nies- und Juckreiz durch Vasodilatation und Hypersekretion der Drüsen führt (Lundberg, 1987; Tani, 1990; Chaen, 1993; Gawin, 1993). Neben den Kininen als wesentlichen Mediatoren der perennialen allergischen Rhinitis (Turner, 1999) spielen zusätzlich auch die durch Histaminreizung freigesetzten Neuropeptide CGRP und Substanz P als Neurotransmitter in antidromen Reflexbögen, bei der neurogenen Entzündung und Mastzellaktivierung eine wesentliche Rolle (Devillier, 1988; Chaen, 1993; Nieber, 1991; Schierhorn, 1995; Turner, 1999). Konno (1996) konnte an Patienten mit perennialer Allergie einen direkten zusätzlichen Einfluss von SP an den Widerstandsund Kapazitätsgefäßen mit konsekutiver Erhöhung des Nasenatmungswiderstandes belegen. Fajac (1995) wies einen direkten Einfluss von SP auf die Proliferation von Eosinophilen nach. Die neurogene Entzündung unterliegt wiederum einer Modulation durch Mediatoren wie Leukotrienen, Kininen und Tachykininen (Turner, 1999). Mittels Radioimmunoassay konnte Fang (1998) eine erhöhte Konzentration von CGRP und SP in der allergischen Nasenschleimhaut finden. Externe Reize, die zur IgE-vermittelten, allergischen Hyperreaktivität führen, werden über das subepitheliale Nervenfasernetz an die Kapillaren und Drüsen weitergeleitet. Turner vermutet eine zusätzliche Reizung exponierter sensibler Nervenfasern bedingt durch das geschädigte Epithel bei allergischer Hyperreaktivität. Bei den hier vorliegenden Untersuchungen konnten keine intraepitheliale Nervenendigungen gefunden werden. Somit kann der o.g. Reizmechanismus nur bei erheblichen Epithelschäden mit Freilegung des subepithelialen Nervennetzes angenommen werden. Durch immunhistochemische und immunelektronenmikroskopische Techniken waren die Neuropeptide CGRP und Substanz P im Vergleich zur entzündungsfreien Nasenschleimhaut vermehrt in periglandulären Nervenfasern aufzufinden. Über axonale Reflexe können diese Neuropeptide eine Sekretionssteigerung an den Drüsen herbeiführen (Chaen, 1993; Fang, 1998). In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden erstmals neben der schon von Alving (1990) beim Schwein beobachteten morphologischen Assoziation von neuropeptidhaltigen Nervenfasern zu Mastzellen enge Lagebeziehungen und Kontakte zwischen neuropeptidhaltigen Nervenfasern und Plasmazellen aufgezeigt. Nach Stimulation dieser sensorischen Nerven kann die Neuropeptidfreisetzung an Mastzellen zur Histaminausschüttung führen. Die neuropeptiderge Modulation der Antikörperproduktion von Plasmazellen kann neben einer direkten Beeinflussung der Histaminfreisetzung über SP-haltige Neurone an Mastzellen (Devillier, 1988; Bernstein, 1991; Chaen, 1993) als weiterer peptiderger Regulationsmechanismus bei der Rhinitis allergica aufgefasst werden

5.6.3 Hyperreaktive Rhinopathie

Im Gegensatz zur spezifischen Hyperreaktivität der Nasenschleimhaut bei der allergischen Rhinopathie besteht bei der früher als vasomotorische oder hyperreflektorische Rhinitis bezeichneten unspezifischen hyperreaktiven Rhinopathie eine Schleimhautreaktion auf Irritantien aus der Umwelt, körperliche Belastungen und Lageveränderungen (Änggard, 1993; Corey, 2000). Auch hier dominieren die Symptome Hypersekretion, nasale Obstruktion sowie Juck- und Niesreiz (Terrahe, 1985; Albegger, 1988; Corey,; 2000). Die Prävalenz der hyperreaktiven Rhinopathie kann auf ca. 15% geschätzt werden (Heppt, 1995). Von Terrahe (1985) wurden für die Entstehung der Symptome vorrangig die pathologische Mastzelldegranulation und eine Beteiligung des parasympathischen Nervensystems verantwortlich gemacht. Pathophysiologisch wird heute den Leukotrienen und durch Neuropeptide ausgelösten, nerval-reflektorischen Abläufen eine besondere Rolle zugesprochen (Wolf, 1988; Philip, 1995). Im Vergleich zu den Veränderungen bei der allergischen Rhinopathie wurden bei der unspezifischen Hyperreaktivität deutlich weniger eosinophile Leukozyten sowie kaum Mastzellen und Plasmazellen gefunden. In Übereinstimmung mit Corey (2000) konnte elektronenmikroskopisch die von Hällgren (1991) beschriebene Eosinophilie bei der unspezifischen Hyperreaktivität in der Nasenschleimhaut des Menschen nicht bestätigt werden. Dieser Befund deutet auch auf den nichtallergischen Charakter der Rhinopathie hin. Das dichte Innervationsmuster und der Nachweis der quantitativ vermehrt auftretenden Neuropeptide SP, CGRP und VIP an den Drüsen sowie im subepithelialen Bindegewebe belegen morphologisch die zu Grunde liegende "neurogene Entzündung" (Wolf, 1988). Die seromukösen Drüsen zeigten, wie schon von Elwany (1987) beschrieben, vermehrt Mitochondrien und ein ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum als Zeichen der Hypersekretion. Hier bestehen morphologische Übereinstimmungen mit der allergischen Rhinopathie. Während Klaassen (1988) das subepitheliale Nervenfasernetz dem klassisch-vegetativen Nervensystem zuordnete, kann heute auch eine Beteiligung von neuropeptidergen und nitrergen Nerven angenommen werden. Über CGRP- und SP-haltige Nervenfasern scheint besonders bei der allergischen und unspezifischen hyperreaktiven Rhinopathie eine direkte Verbindung der Umgebung zu den Erfolgsorganen wie Schwellgewebe und Drüsen zu bestehen. Bei verschiedenen chemischen mechanischen und thermischen Einflüssen kann über eine Reizung dieser sensorischen Nerven ein zentral-afferenter und antidrom-efferenter Impuls ausgelöst und nach einer Sekretionssteigerung der Drüsen ein "neurogenes Ödem" verursacht werden (Albegger, 1988; Stjärne, 1989). Die Drüsen unterliegen dabei unspezifischen, hyperreaktiven Sekretionsmechanismen (Stjärne, 1991). Zusätzlich liegen ultrastrukturell nachweisbare Veränderungen der Kapillarwand vor, die zur Entwicklung des Schleimhautödems beitragen. Die dargestellten Stressfilamente und die vermehrten Pinozytosevesikel weisen auf besonders aktive Transport- und Austauschprozesse im Bereich der Kapillaren hin (Elwany, 1987). 1977 wurde von Jahnke noch die Durchtrennung des Nervus vidianus als Therapiemöglichkeit bei vasomotorischer Rhinitis angegeben (Jahnke, 1977). Die Erfolgsrate war jedoch bei nur schwacher Hemmung der Hypersekretion gering (Albegger, 1988), was auch auf die wesentliche Rolle der sensorischen Neuropeptide in den Capsaicinsensitiven, sensorischen Nerven und deren Beteiligung am Axonreflex hinweist. Aktuelle in vivo-Untersuchungen am Schwein und der Ratte konnten nun zukunftsweisend einen günstigen Effekt von CGRP-Rezeptor-Antagonisten bei der chronisch hyperreaktiven Rhinitis zeigen (Rist, 1999).

5.7 Medikamentöse Therapie von Rhinopathien

Ausgehend von den nun vorliegenden morphologischen Befunden zur Transmitterverteilung an den Gefäßen (Riederer/ Knipping, 1993; 1995) und den seromukösen Drüsen (Knipping, 1995; 2001) der menschlichen Nasenschleimhaut der nachgewiesenen Beteiligung von sowie Neuropeptiden und von Stickstoffmonoxid bei pathophysiologischen Prozessen verschiedener Rhinopathien ergeben sich Überlegungen zu neuen Therapieoptionen. Zur Behandlung der mit Rhinopathien assozierten nasalen Obstruktion wurden und werden zunächst abschwellende Nasentropfen und -sprays eingesetzt, die jedoch keinen Effekt auf die Hypersekretion, den Nies- und Juckreiz haben. Die lokal vasokonstriktorisch wirkenden α-sympathomimetischen Amine Ephedrin und Phenylephrin und deren Imidazolderivate Naphazolin und Xylometazolin sind in topischen Darreichungsformen anwendbar (Corey, 2000). Über Aktivierung von α₂-Rezeptoren kommt es zur Vasokonstriktion der Gefäße des Schwellgewebes. Auf Grund der schon lange bekannten Entwicklung einer Tachyphylaxie mit Ausbildung einer Rhinopathia medicamentosa ist deren Einsatz jedoch zeitlich eingeschränkt (Kully, 1945). Petruson konnte 1982 mit rasterund elektronenmikroskopischen Untersuchungen nach 6 wöchiger Gabe von Xylometazolin keine Veränderungen der nasalen Oberflächenstrukturen erkennen. Durch eigene Untersuchungen konnten iedoch ausgeprägte Mikrozirkulationsstörungen besonders im arteriellen und kapillären Gefäßsystem schon nach 14 tägiger Naphazolingabe festgestellt werden (Agha-Mir-Salim/ Knipping, 2001). Von Graf wurde die Entwicklung eines interstitiellen Ödems als morphologisches Substrat bei der Rhinopathia medicamentosa beschrieben (Graf, 1995).

Zur Therapie von Symptomen der spezifischen (allergischen) und unspezifischen Hyperreaktivität stehen zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung. Neben der Vermeidung des Kontakts mit spezifischen Allergenen (Allergenkarenz) bzw. auslösenden Umweltfaktoren kann eine Pharmakotherapie mit Antihistaminika (z.T. in Kombination mit abschwellenden Rhinologika), Cortikosteroiden, Mastzellstabilisatoren und eine spezifische Immuntherapie (SIT) angewendet werden (Heppt, 1997; Durham, 1998; Corey, 2000; Riechelmann, 2000). Bei akuten allergischen Zwischenfällen kommen vorwiegend Antihistaminika der 1. Generation wie Dimetinden und Clemastin zum Einsatz. Die antihistaminergen Substanzen der 2. Generation mit nicht sedierenden Eigenschaften wie Loratadin und Cetirizin eignen sich besonders zur Therapie der saisonalen Rhinitis allergica. Auch topische Antihistaminika wie Levocabastin und Azelastin stehen zur Behandlung von saisonal bedingten allergischen Beschwerden als Augen- und Nasentropfen zur Verfügung. Außerdem können Glukokortikoide topisch (Mometason, Fluticason, Beclometason) und gelegendlich kurzzeitig systemisch angewendet werden. Hierbei wird eine Entzündungshemmung durch Rückgang der Mastzell- und Eosinophileninfiltration des Gewebes, eine Minderung der Hyperreaktivität und Gefäßpermeabilität mit Reduktion des interzellulären Ödems, eine Reduktion T-Lymphozytenzahl sowie eine der Senkung der Mediatorfreisetzung bewirkt (Heppt, 1997; Corey, 2000, Mygind, 2001). Glukokortikoide zeigen einen positiven Effekt auf die nasale Obstruktion, die Hypersekretion sowie den Nies- und Juckreiz.

Mastzellstabilisatoren (Cromoglycinsäure, Nedocromil) mit Hemmung der Mastzelldegranulation werden topisch besonders zur Unterstüzung der SIT eingesetzt (Riechelmann, 2000). Ein zusätzlicher hemmender Effekt der Cromoglycinsäure auf sensorische Neurone wird diskutiert (Woodhead, 1994).

Durch klinische Beobachtungen konnte der nur mangelhafte Effekt von Anticholinergika auf die Hypersekretion und Vasodilatation bei hyperreaktiven Rhinopathien festgestellt und damit die Vermutung aufgestellt werden, dass noch weitere vasoaktive Stoffe existieren müssen (Albegger, 1988). Nach der Entdeckung von vasoaktiven und sekretionsstimulierenden Neuropeptiden in der Nasenschleimhaut wurde auch nach Möglichkeiten zur therapeutischen Beeinflussung gesucht. Die Entwicklung spezifischer Neuropeptidinhibitoren bzw. von Neuropeptidantagonisten gestaltete sich jedoch schwierig. Durch den

92

schnellen Abbau über Peptidasen können Peptidantagonisten nur für einige Minuten ihre Wirkung entfalten (Woodhead, 1994). Ungenügende Spezifität und Wirkstärke der oft nur als partielle Agonisten wirkenden Substanzen stellten ernsthafte Probleme dar (Barnes, 1987). Die Entwicklung von Inhibitoren der Neuropeptidfreisetzung erschien daraufhin erfolgversprechender als der Einsatz von spezifischen Neuropeptidblockern. So wurde z.B. der positive Effekt von Clonidin, einem alpha-2-Rezeptor-Agonisten, auf die noncholinerge Bronchokonstriktion und das Asthma bronchiale entdeckt (Barnes, 1987).

Neue Therapieansätze bestehen in der Entwicklung von Stoffen, die in neurogene Entzündungsabläufe eingreifen und die Synthese von Neuropeptiden und Stickstoffmonoxid hemmen können. Zur Beeinflussung der in sensorischen Neuronen der Nasenschleimhaut vorkommenden Neuropeptide SP und CGRP stehen folgende Mechanismen zur Verfügung :

1. die Blockade von NK1-(Tachykininrezeptor) und CGRP1-Rezeptoren

2. die Förderung von neuropeptidabbauenden Peptidasen

3. die Beeinflussung der sensorischen Neurone Typ C durch Anwendung von Capsoiden (Capsaicin).

Zu 1: Auf Grund der nachgewiesenen NK₁- und CGRP₁-Rezeptoren an Drüsen, Gefäßen und in der subepithelialen Region und der bekannten Wirkungen dieser Neuropeptide verwies Uddman (1999) auf einen möglichen therapeutischen Effekt von CGRP₁-Rezeptor-Antagonisten besonders bei der Rhinitis allergica (Uddman, 1999). Der CGRP-Rezeptorantagonist CGRP 8-37 zeigte positive Wirkung auf die CGRP-induzierte Vasodilatation in der Nasenschleimhaut des Schweins (Rinder, 1996). Von Malis (2000) konnten am Schwein nachweisbare Wirkungen auf die durch CGRP und Capsaicin ausgelöste Vasodilatation durch den CGRP₁-Rezeptorantagonist CGRP 27-37 festgestellt werden.

Zur nachweisbaren Beeinflussung der durch SP induzierten Hypersekretion (Petersson, 1989) und Vasodilatation führte der systemisch applizierte NK₁-Rezeptorantagonist SR 140.333 beim Schwein (Rinder, 1989). Auch Kortikosteroide scheinen einen modulierenden Effekt auf Neuropeptidrezeptoren auszuüben (Woodhead, 1994).

Ebenso könnten Leukotrien- und Tachykinin-Inhibitoren, bei denen eine Beeinflussung der Atemwegshyperreaktivität im Tiermodell nachgewiesen wurde, neue Therapieoptionen für die allergische Rhinopathie eröffnen. Dabei scheint die Kombination von Leukotrien-Rezeptorantagonisten mit Antihistaminika eine Verbesserung der allergisch bedingten Symptome zu bewirken (Diamant, 2001). Lipoxygenaseinhibitoren können unterdessen erfolgreich in der Behandlung des Asthma bronchiale und der Rhinitis allergica eingesetzt werden (McMillan, 1991; Woodhead, 1994).

Zu 2: Die neutrale Endopeptidase (NEP 24,11), die Dipeptidylaminopeptidase IV, die Carboxypeptidase N (CPN) und das Angiotensin Converting Enzym (ACE) beteiligen sich am Abbau der Neuropeptide (Nadel, 1992; Gawin, 1993; Hauser-Kronberger, 1994; Ohkubo, 1994). Diese Enzyme, die sich auch am Abbau von Neurokininen und Bradykinin beteiligen sollen, wurden nicht nur in seromukösen Drüsen, sondern auch im Gefäßendothel und im Epithel nachgewiesen (Petersson, 1989: Baraniuk, 1990: Ohkubo, 1994). Durch Zigarettenrauch und Virusinfektionen können über Konzentrationsminderung der NEP die Neuropeptidwirkungen zunehmen (Nadel, 1992). Nadel konnte am Meerschweinchen mit humaner rekombinanter NEP einige Tachykininwirkungen verhindern (Nadel, 1992). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt liegen jedoch noch keine konkreten Konzepte zur therapeutischen Beeinflussung der Peptidasen vor. Möglicherweise wirken Kortikosteroide auch über eine Stimulation der NEP und damit antagonistisch zu den Neuropeptidwirkungen (Woodhead, 1994).

Zu 3: Auf Grund der nachgewiesenen neuropeptidergen Beteiligung bei der allergischen und unspezifischen Hyperreaktivität kann neben der konventionellen Therapie auch an eine Capsaicin-Behandlung gedacht werden (Stjärne, 1991; Baluk, 1992; Agha-Mir-Salim, 1998). Dieses Alkaloid (8-Methyl-N-Vanillyl-6-Nonenamid) ist der scharfe Bestandteil der Paprika- bzw. Pfefferschoten. Durch Capsaicin wird zunächst eine akute Freisetzung von SP und CGRP aus peripheren und zentralen Neuronen mit nachfolgender Vasodilatation verursacht (Alving, 1990; Eberle, 1994). Wiederholte Applikation führt konsekutiv zur Depletion neuropeptiderger, nozizeptiver, sensorischer Nervenendigungen (Typ C), zum Verlust der Sensitivität gegenüber verschiedenen chemischen Irritantien (z.B. auch Nikotin) und damit zur Unterdrückung der Neuropeptidwirkungen (Lundblad, 1984; Wolf, 1987; Stjärne, 1991; Gawin, 1993; Mosimann, 1993). Die Gabe von Capsaicin gemeinsam mit einem Lokalanästhetikum, um den initialen Schmerzreiz zu mindern, konnte bei Patienten mit therapieresistenter hyperreaktiver Rhinopathie erfolgreich eingesetzt werden (Baraniuk, 1991). Stjärne und Lacroix

stellten nach kurzer topischer Capsaicinbehandlung einen positiven und langanhaltenden Effekt auf die nasalen Symptome der nichtallergischen Rhinitis fest (Stjärne, 1991; Lacroix, 1992). Capsaicin wirkt über eine Blockade zentraler Reflexe und lokaler Wirkungen von Irritantien durch Interaktion mit sensorischen 1991). Ferner wird Nervenendigungen (Stjärne, eine Abnahme der immunologischen Reaktivität von CGRP und ein Effekt von Capsaicin auf Entzündungszellen der Nasenschleimhaut diskutiert. Wolf und Mitarbeiter konnten positive, nebenwirkungsfreie und langanhaltende Effekte von Capsaicin bei der "hyperreflektorischen Rhinopathie" beobachten (Wolf, 1988; 1995). Von Zheng wurde durch intranasale Capsaicingabe nach Polypektomie eine verringerte Rezidivrate der Polyposis nasi sowie eine postoperative Verbesserung der Nasenatmung festgestellt (Zheng, 2000).

Capsaicin-Langzeiteffekte über 6 Monate hinaus finden sich in der Literatur jedoch nicht (Lacroix, 1992; Woodhead, 1994).

Über die bekannten Effekte von NPY könnten sich ebenfalls neue therapeutische Möglichkeiten ergeben. Auf Grund der langanhaltenden vasokonstriktorischen Wirkung von NPY über postsynaptische Y₁-Rezeptoren an den Gefäßen der Nasenschleimhaut ist die Entwicklung von NPY-Agonisten zur Therapie von Rhinopathien mit vorwiegend nasaler Obstruktion in Zukunft denkbar (Baraniuk, 1992; Guarnaccia, 1994; Cervin, 1999). Malis konnte mit einem intranasal applizierten NPY Y₂–Agonisten (TASP-V) die Abschwächung einer histaminvermittelten nasalen Obstruktion bei gesunden Probanden erreichen (Malis, 1999). Bei Patienten mit Rhinitis allergica kann durch intranasale Applikation von NPY oder NPY-Agonisten eine Allergen-induzierte Obstruktion und Schleimsekretion vermindert werden (Hauser-Kronberger, 1993; Lacroix, 1996; Cervin, 1999; Uddman, 1999).

Hier bestehen Ansätze zur Entwicklung von rhinologischen Therapeutika für Patienten mit allergischer Hyperreaktivität. Wegen der in der Nasenschleimhaut vorkommenden, oben beschriebenen proteolytischen Endopeptidase sollte auf eine relative Resistenz der NPY-Analoga vor protrahierter Degranulation geachtet werden. Zur Förderung der Wirkungen des Neuropeptids NPY wurden Tierversuche mit Peptidaseinhibitoren durchgeführt. Beim Hund konnten Revington und Lacroix eine Verlängerung der NPY-Wirkungen durch simultane Gabe des Endopeptidaseinhibitors Phosphoramidon erreichen (Revington, 1997). Nachdem auch für Stickstoffmonoxid eine wesentliche Beteiligung an pathophysiologischen Abläufen der Nasenschleimhaut nachgewiesen wurde, könnte NO-Antagonisten der Einsatz von zur Beeinflussung von Entzündungsmechanismen therapeutisch wirkungsvoll sein. Eine Hemmung der NO-vermittelten Vasodilatation wäre ebenfalls denkbar. Mediatoren wie Histamin und Bradykinin sollen bei pathologischen Schwellungen der Nasenschleimhaut nicht nur direkt an der Gefäßmuskulatur wirken, sondern auch über eine gesteigerte iNO-Synthese den Gefäßtonus beeinflussen können (Riederer, 1999; Heß, 2000).

Durch Ueda konnte bei Versuchen am Meerschweinchen gezeigt werden, dass bei Entzündungsprozessen die iNOS über eine erhöhte NO-Produktion zur Abnahme der Zilienschlagfrequenz führte. Dieser Mechanismus konnte durch Dexamethason bzw. Applikation von L-Argininmethylester (L-NAME), einem NOS-Inhibitor, gehemmt werden (Ueda, 2001). Da NO aus den Aminosäuren L-Arginin unter Vermittlung der NO-Synthasen synthetisiert wird, kann der Synthesevorgang durch im Überschuß vorhandene L-Arginin-Analoga wie z.B. N^{ω}-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) oder N^{ω}-Nitro-L-Arginin (L-NNA) inhibiert werden (Palmer, 1988). Rinder konnte am Schwein mit L-NNA signifikant den nasalen Atemwegswiderstand reduzieren (Rinder, 1996).

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die nachgewiesenen Effekte der o.g. Substanzen auch auf den Menschen zu übertragen und therapeutisch anwendbar zu machen.

6. Zusammenfassung

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurde der Zusammenhang zwischen der Funktion der seromukösen Drüsen der Nasenschleimhaut und deren Steuerungsmechanismen noch nicht endgültig geklärt. In vorhergehenden Untersuchungen konnten immer nur Teilaspekte zur Innervation der Gefäßstrukturen und der Drüsen der Nasenschleimhaut erarbeitet werden. Dafür kamen insbesondere histochemische und immunfluoreszenzmikroskopische Methoden sowie Silberimprägnationsverfahren zum Einsatz. Zur Lokalisation der verschiedenen Neurotransmitter bisher vereinzelt liegen nur immunelektronenmikroskopische Untersuchungen, die größtenteils an der Nasenschleimhaut von Tieren durchgeführt wurden und damit nicht auf den Menschen übertragbar sind, vor. Eine umfangreiche Darstellung des Innervationsmusters der Drüsen fehlt bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt. Durch die hier angewendeten immunhistochemischen, ultrastrukturellen und insbesondere immunelektronenmikroskopischen Techniken konnte eine differenzierte Darstellung der Nervenversorgung der seromukösen Drüsen und der Veränderungen bei verschiedenen Rhinopathien erreicht werden.

Gewebeproben der unteren Nasenmuschel von insgesamt 141 Patienten wurden an Hand von Paraffin-, Gefrier-, Semidünn- oder Ultradünnschnitten untersucht. Die Präparate kamen mit Antikörpern gegen neuronale Bestandteile (neuronenspezifische Enolase (NSE), Neurofilamente) und Schwann-Zellen (S-100 Protein) zur Inkubation. Hierbei konnte die Grundinnervation der seromukösen Drüsen und des umliegenden Gewebes analysiert werden. Darauf aufbauend zeigten ultrastrukturelle Untersuchungen Ergänzungen und Details der Drüseninnervation.

Zum Nachweis eines detailierten Innervationsmusters wurden Antikörper gegen folgende Neurotransmitter eingesetzt: Ak gegen Tyrosinhydoxylase (TH), Cholinazetyltransferase (ChAT), vasointestinales Polypeptid (VIP), Calcitonin gene related Peptid (CGRP), Substanz P (SP) und Neuropeptid Y (NPY). Stickstoffmonoxid (NO) wurde mittels Antikörpern gegen die neuronale NO-(nNOS) und endotheliale NO- (eNOS) Synthase lokalisiert. Zur Markierung der Bindungsstellen diente als Detektionsmethode vorrangig die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)- Methode. Mittels histochemischer Verfahren erfolgte der Nachweis der cholinergen Innervation (AChE) und der nitrergen-cholinerg Koinnervation (NADPH-d/ AChE). Die immunhistochemischen Befunde wurden durch immunelektronenmikroskopische Methoden bestätigt und somit durch weitere Details vervollständigt.

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse findet sich im *Schema 2* des Anhangs.

Folgende Erkenntnisse können nach den vorliegenden morphologischen Untersuchungen postuliert werden:

1. Die seromukösen Drüsen der Nasenschleimhaut des Menschen weisen eine dichte Nervenversorgung auf. Die dargestellten Nervenfasern zeigen eine enge Lagebeziehung zu den Azinuszellen und bilden auch neuroglanduläre Kontaktstellen.

Eine hohe Dichte nervaler Strukturen zeigte sich teils korbartig an den Azinuszellen, im Bereich der Drüsenausführungsgänge und im subepithelialen Bindegewebe.

2. Basierend auf den Befunden zur Gesamtinnervation konnten in den periglandulären Nervenfasern Neurotransmitter des sympathischen, parasympathischen und sensorischen Nervensystems mit unterschiedlichem Verteilungsmuster identifiziert werden. Eine Prädominanz von cholinergen Nervenfasern war im Gegensatz zum vereinzelten Auftreten von aminergen Nerven im periglandulären Bindegewebe auffällig. Das dichte cholinerge Nervenfasernetz an den Drüsenendstücken und im Bereich der Ausführungsgänge deutet auf die dominierende Rolle des parasympathischen Systems im Sinne einer Sekretionssteigerung der Drüsen hin. Die Drüsenfunktionen unterliegen somit einer gemischten cholinerg-aminergen Grundinnervation mit Beteiligung von peptidergen und nitrergen Nervenfasern.

3. Alle in dieser Studie untersuchten Neuropeptide konnten in direkter oder unmittelbarer Beziehung zu den Drüsen dargestellt werden. Der Nachweis VIPhaltiger Axone in unmittelbarer Umgebung der Azinuszellen und an den Ausführungsgängen deutet auf eine direkte Beeinflussung der Sekretproduktion und der Sekrettransportvorgänge durch VIP hin. VIP kommt hier als Kotransmitter in cholinergen Nerven eine neuromodulatorische Rolle zu. CGRP und SP, nur vereinzelt in Kontakt zu den Azinuszellen darstellbar, konnten besonders im subepithelialen Bindegewebe nachgewiesen werden. Als Transmitter in sensorischen Nerven scheinen CGRP und SP über Axonreflexe und bei der "neurogenen Entzündung" eine wesentliche Rolle durch direkte Beeinflussung der seromukösen Drüsen zu spielen.

Eine grundlegende Beteiligung der Neuropeptide CGRP und SP zeigte sich morphologisch bei Patienten mit allergischer und unspezifischer Hyperreaktivität.

Der in sympathischen Nervenfasern nachgewiesene Kotransmitter NPY scheint für die Regulation des Blutflusses und des Blutvolumens in den Austausch- und Kapazitätsgefäßen bedeutsam zu sein. NPY kann neben einer nervalen Beeinflussung der Drüsenfunktionen auch eine indirekte Regulation der Durchblutung des periglandulären Bindegewebes und damit der Drüsenversorgung bewirken.

4. Stickstoffmonoxid beteiligt sich auf verschiedene Weise an der Regulation der physiologischen Funktionen der Nasenschleimhaut. Immunreaktive nitrerge Nervenfasern finden sich in Axonen um die seromukösen Drüsen und im Bereich arterieller Gefäße. Besonders in drüsennahen Kapillaren und Arteriolen konnte endotheliale NOS nachgewiesen werden. Im endothelialen Zytoplasma von Kapillaren und Arteriolen war eine starke Akkumulation von NO darstellbar. An Fibroblasten des Stromas wurden intensive Immunreaktionen beobachtet. Nach Darstellung mittels Doppelhistochemie (NADPH-d/ AChE-Doppelfärbung) kann NO als Kotransmitter in parasympathischen Nervenfasern ein neuromodulatorischer. vasodilatatorischer Effekt an Gefäßen und eine stimulierende Wirkung an seromukösen Drüsen zugeschrieben werden. Endothelial gebildetes NO scheint eine relaxierende Wirkung besonders an arteriellen Gefäßen und periglandulären Kapillaren auszuüben. Das Vorkommen von NO an Fibroblasten kann bei strukturellen Veränderungen durch Rhinopathien eine Rolle zu spielen.

5. Die Beteiligung verschiedener Neurotransmitter an der Regulation der Drüsenfunktionen, insbesondere der Neuropeptide VIP, CGRP, NPY und SP konnte durch elektronenmikroskopische und immunelektronenmikroskopische Befunde morphologisch bestätigt werden. Neuropeptide wurden in "dense core vesicles" gebunden und im Axoplasma periglandulärer Nerven gefunden.

6. Insbesondere durch ultrastrukturelle Methoden konnte die enge Lagebeziehung von Nervenfasern zu Azinuszellen bzw. Drüsenausführungsgängen gezeigt werden. In direkter Lagebeziehung zu den Drüsenzellen fanden sich fast ausschließlich nicht myelinisierte Nervenfasern.

7. Ultrastrukturell konnten vereinzelt neuroglanduläre Kontaktstellen in Form von nicht myelinisierten Nervenendigungen an den Drüsenzellen dargestellt werden.

8. Auf Grund des nur vereinzelten Auftretens von neuroglandulären Synapsen wird eine vorrangige Übertragung der Transmittersubstanzen "by distance" vermutet. Hierbei gelangen die neurotransmitterhaltigen Vesikel über Bindegewebsspalten an die Effektorzellen.

9. Im periglandulären Bindegewebe wurden regelmäßig fenestrierte Kapillaren gefunden. Da in unmittelbarer Umgebung der Kapillaren morphologisch keine

Axone nachweisbar waren, scheint eine direkte nervale Kontrolle des kapillären Gefäßtonus nicht vorzuliegen. Eine indirekte Regulation des Gefäßtonus und damit auch der periglandulären, kapillären Durchblutung wird hier den drüsennahen Arteriolen, die einer Kontrolle durch sympathische, NPY- und NOhaltige Nerven unterliegen sowie den Postervenen, die einer parasympathischen und nitrergen Kontrolle unterliegen, zugesprochen. Durch eine Zunahme des intrakapillären Gefäßdruckes, bedingt durch arterioläre Vasodilatation und venöse Abflussdrosselung kann es zur vermehrten Plasmaexsudation und damit zu einem vermehrten Substratangebot für die Drüsen kommen. Eine vaskuläre Beeinflussung der Drüsenfunktionen ist auf diesem Wege anzunehmen.

10. Drüsenausführungsgänge zeigen im wesentlichen das gleiche Innervationsund Vaskularisationsmuster wie die Azinuszellen. Somit scheint eine nervale Kontrolle von Transport- und Austauschvorgängen im Ausführungsgangsystem vorzuliegen.

11. Die komplexen physiologischen Funktionen der seromukösen Drüsen, einem Hauptbestandteil der respiratorischen Nasenschleimhaut, unterliegen einer umfangreichen nervalen Kontrolle und einer Beeinflussung durch klassischvegetative, neuropeptiderge und nitrerge Neurotransmitter. Zusätzlich bestehen Modulations- und Regulationsmöglichkeiten der Drüsenfunktionen über die periglanduläre Gefäßversorgung.

12. Die häufig auftretenden hyperreaktiven Rhinopathien zeigen morphologische Besonderheiten. Die Beteiligung einiger vasoaktiver und sekretionsregulierender Neuropeptide konnte morphologisch bestätigt werden. So beteiligen sich insbesondere die Neuropeptide CGRP und SP an pathophysiologischen Abläufen bei der spezifischen (allergischen) und unspezifischen nasalen Hyperreaktivität.

13. Der morphologische Nachweis der Beteiligung o.g. Neurotransmitter an verschiedenen Rhinopathien kann die Grundlage für die zukünftige Entwicklung geeigneter Inhibitoren bzw. Antagonisten bilden. Eine Hyposensibilisierung sensorischer Neurone durch Capsaicin, der protrahierte Neuropeptidabbau durch Endopeptidasen, die Blockade von Neuropeptid-Rezeptoren mit spezifischen Antagonisten und die Hemmung der NO-Synthese durch L-Arginin-Analoga stellen mögliche Interventionsmöglichkeiten dar.

Die vorliegenden Ergebnisse sollen neben der Erarbeitung des Innervationsmusters der seromukösen Drüsen auch einen Beitrag zur Erweiterung des

pathophysiologischen Kenntnisstandes zur Entwicklung von Rhinopathien leisten. Weitere Untersuchungen zur Frage der Neurotransmitterverteilung, deren Rezeptoren in der Nasenschleimhaut der unteren Nasenmuschel und im Bereich des mittleren Nasenganges sowie bei der Polyposis nasi befinden sich derzeit in Vorbereitung.

7. Literaturverzeichnis

- Adams DR, Deyoung DW, Griffith R (1981) Lateral nasal glands of the dog: its structure and secretory content. J Anat 132: 29-37
- (2) Agha-Mir-Salim S, Baumgarten C, Jahnke V, Niedobitek G, Kunkel G (1991) Presence of vasoactive intestinal peptide receptors in nasal mucosa. Skin Pharmacol 4 (3): 213-219
- (3) Agha-Mir-Salim P, Merker HJ (1992) Elektronenmikroskopische und immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Basalmembran der menschlichen Nasenschleimhaut. Allergologie 15(7): 229-232
- (4) Agha-Mir-Salim P, Merker HJ, Jahnke V, Berghaus A (1998) Die Drüsen der menschlichen Nasenschleimhaut-elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen. Laryngo Rhino Otol 77: 322-327
- (5) Agha-Mir-Salim P, Stange Th, Knipping St, Jahnke V, Berghaus A (2001) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Nasenschleimhaut des Kaninchens nach kurzzeitiger Applikation von Naphazolinnitrit. Laryngo Rhino Otol 80: 389-393
- (6) Albegger K (1980) Zur Rhinosinusitis des Kindes aus HNO-ärztlicher Sicht. HNO 28: 321-328
- (7) Albegger K (1988) Nasale Hyperreagibilität und hyperreflektorische (vasomotorische) Rhinopathie. Allergologie 11: 139-149
- (8) Albegger K, Hauser-Kronberger CE, Saria A, Graf AH, Bernatzky G, Hacker GW (1991) Regulatory Peptides and General Neuroendocrine Markers in Human Nasal Mucosa, Soft Palate and Larynx. Acta Otolaryngol (Stockh) 111: 373-378

- (9) Al-Rawi MM, Edelstein DR, Erlandson RA (1998) Changes in nasal epithelium in patients with severe chronic sinusitis: a clinicopathologic and electron microscopic study. Laryngoscope 108 (12): 1816-1823
- (10) Alving K (1990) Airways vasodilatation in the immediate allergic reaction. Acta Physiol Scand Suppl 597: 1-64
- (11) Änggard A (1974) Autonomic nervous control of blood circulation and secretion in the nasal mucosa. Thesis: Dep. Pharmacol., Karolinska Inst Stockholm
- (12) Änggard A (1977) Parasympathetic Influence on the Nasal Mucosa.Acta Otolaryngol (Stockh) 83: 22-24
- (13) Änggard A (1993) Basic mechanisms in autonomic nervous responses in specific and nonspecific nasal hyperreactivity. Acta Otolaryngol (Stockh)113: 394-396
- (14) Amores AE, Spekelsen C, Bernal-Spekelsen M (1991) Immunoreactive nerve fibers in the nasal mucosa. Eur Arch Otorhinolaryngol 248: 487-491
- (15) Auberson S, Lacroix JS, Lundberg JM (1999) Different ion channel control pH6-induced bronchoconstriction and calcitonin gene-related peptide release in the guinea-pig. Pharmacol Toxicol 84(4): 181-186
- (16) Bachert C (1995) Exfoliativzytologie unter Verwendung immunhistochemischer Techniken. In: Heppt W: Nasenzytologie Springer :107-124
- (17) Bachert C (1996) Klinik der Umwelterkrankungen von Nase und Nasennebenhöhlen-Wissenschaft und Praxis. Oto Rhino Laryngol (Suppl 1): 73-146

- (18) Baluk P, Nadel JA, McDonald DM (1992) Substance P-immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: a quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation. J Comp Neurol 319(4): 586-598
- (19) Baraniuk JN, Castellino S, Goff J, Lundgren JD, Mullol J, Merida M, Shelhamer JH, Kaliner MA (1990) Neuropeptide Y (NPY) in human nasal mucosa, and analysis of secretory responses in vitro and in vivo. Am Rev Respir Dis 141 : 706-714
- (20) Baraniuk JN, Lundgren J, Okayama M, Mullol J, Merida M, Shelhamer J, Kaliner M (1990) Vasoactive Intestinal Peptide in Human Nasal Mucosa. The J Clin Invest 86: 825-831
- Baraniuk JN, Kaliner MA (1990) Neuropeptides and nasal secretion. J Allergy Clin Immunol 86: 620-627
- (22) Baraniuk JN, Lundgren JD, Goff J, Mullol J, Castellino S, Merida M, Shelhamer JH, Kaliner MA (1990) Calcitonin gene-related peptide in human nasal mucosa. Am J Physiol 258: 81-88
- (23) Baraniuk JN, Kaliner MA (1991) Neuropeptides and nasal secretion. Am J Physiol 261 (4 Pt 1): 223-235
- (24) Baraniuk JN (1991) Neural Control of Human Nasal Secretion. Pulmon Pharmac 4: 20-31
- (25) Baraniuk JN, Silver PB, Kaliner MA, Barnes PJ (1992) Neuropeptide Y is a vasoconstrictor in human nasal mucosa. J Appl Physiol 73(5):1867-1872
- (26) Baraniuk JN (1992) Sensory, parasympathetic, and sympathetic neural influences in the nasal mucosa. J Allergy Clin Immunol 90: 1045-1050

- (27) Barnes PJ (1987) Neuropeptides in Human Airways: Function and Clinical Implications. Am Rev Respir Dis 136: 77-83
- (28) Barnes PJ (1987) Regulatory peptides in the respiratory system.Experimentia 43 Birkhäuser Verlag Schweiz: 832-838
- (29) Beesley JE (1989) Colloidal gold: A new perspective for cytochemical marking. Microscopy Handbooks 17 Oxford University Press: 1-59
- (30) Bentley AM, Jacobson MR, Cumberworth V, Barkans JR, Moqbel R, Schwartz LB, Irani AM, Kay AB, Durham SR (1992) Immunhistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: Increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. J Allergy Clin Immunol 89: 877-883
- (31) Berhardt J, Tschudi MR, Dohi Y, Gut I, Urwyler B, Bühler FR, et al (1991) Release of Nitric Oxide from Human Vascular Smooth Muscle Cells. Biochem Biophys Res Com 180: 907-912
- (32) Bernstein JM (1991) The role of autonomic nervous system and inflammatory mediators in nasal hyperreactivity: a review. Otolaryngol Head Neck Surg 105(4): 596-607
- (33) Bishop AE, Polak JM, Facer P, Ferri GL et al (1982) Neuron Specific Enolase: A Common Marker for the Endocrine Cells and Innervation of the Gut and Pancreas. Gastroenterology 83: 902-915
- (34) Bock E (1978) Nervous System Specific Proteins. J Neurochem 30: 7-14
- (35) Borkowski G, Gurr A, Stark Th, Philippou S, Sudhoff H (2000) Funktionelle und morphologische Störungen des mukoziliären Systems bei der sekretorischen Otitis media. Laryngo Rhino Otol 79: 135-138

- (36) Boysen-Moller F (1964) Topography of the nasal glands in the rats and some other mammals. Anat Rec 150: 11-24
- (37) Brandtzaeg P, Fjellanger I, Gjeruldsen ST (1967) Localization of immunoglobulins in human nasal mucosa. Immunochemistry 4: 57-60
- (38) Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. Nature 347: 768-770
- (39) Brettschneider H (1957) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Nasenschleimhaut. Anat Anz 41: 194-204
- (40) Brokaw JJ, White GW (1992) Calcitonin Gene Related Peptide potentiates Substance P induced plasma extravasation in the rat trachea. Lung 170: 85-93
- (41) Brook I, Yocum P (1995) Antimicrobial management of chronic sinusitis in children. J Laryngol Otol 109: 1159-1162
- (42) Brown JF, Keates AC, Hanson PJ, Whittle BJR (1993). Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. Am J Physiol 265: 418-422
- (43) Burian K, Stockinger L (1963) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Nasenschleimhaut. Acta Oto Laryng 56: 376-389
- (44) Burnstock G (1990) Local mechanism of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. J Hypertens & Suppl 7: 95-106
- (45) Cauna N, Hinderer KH, Wentges RT (1969) Sensory Receptor Organs of the Human Nasal Respiratory Mucosa. Am J Anat 124: 187-210

- (46) Cauna N, Hinderer KH (1969) Fine Structure of Blood Vessels of the Human Nasal Respiratory Mucosa. Ann Otol Rhinol Laryngol 78: 865-879
- (47) Cauna N (1970) Electron microscopy of the nasal vascular bed and its nerve supply. Ann Otol Rhinol Laryngol 79: 443-450
- (48) Cauna N, Cauna D, Hinderer KH (1972) Innervation of human nasal glands. J Neurocytol 1: 49-60
- (49) Cervin A, Onnerfalt J, Edvinsson L, Grundemar L (1999) Functional effects of neuropeptide Y receptors on blood flow and nitric oxide levels in the human nose. AM J Respir Crit Care Med 160 (5): 1724-1728
- (50) Changqing Z, Zhengde T, Jianyun X, Suping Z, Jiantian Q (1995) An immunocytochemical study on relations between mast cell and peptidergic terminals in nasal mucosa of chronic rhinitis patients. Chinese Medical Journal 108 (8): 606-609
- (51) Chaen T, Watanabe N, Mogi G, Mori K, Takeyama M (1993) SubstanceP and Vasoactive Intestinal Peptide in nasal secretions and plasma from patients with nasal allergy. Ann Otol Rhinol Laryngol 102: 16-21
- (52) Chen Y, Getchell T, Sparks D, Getchell M (1993) Patterns of adrenergic and peptidergic innervation in human olfactory mucosa: Age-related trends. J Comarative Neurology 334: 104-116
- (53) Cocchia D, Michetti F, Donato R (1981) Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. Nature 294: 85-87

- (54) Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc Soc exp Biol Med 47: 200-202
- (55) Corey JP, Houser SM, Ng BA (2000) Nasal congestion: A review of its etiology, evaluation, and treatment. ENT Ear Nose & Throat Journal 79(9): 690-702
- (56) Cortesina G, Carlevato MT, Bussi M, Baldi C, Majore L, Ruffino C
 (1993) Mucosal Immunity in Allergic Rhinitis. Acta Otolaryngol
 (Stockh) 113: 397-399
- (57) Cremaschi D, Rossetti C, Draghetti MT, Manzoni C, Porta C, Aliverti V
 (1991) Transepithelial electrophysiolgical parameters in rabbit respiratory nasal mucosa isolated in vitro. Comp Biochem Physiol 99A
 (3): 361-364
- (58) Crockett DM, McGill TJ, Healy GB, Friedman EM, Salkeld LJ (1987)
 Nasal and paranasal sinus surgery in children with cystic fibrosis. Ann
 Otol Rhinol Laryngol 96: 367-372
- (59) Dahlström A, Fuxe K (1965) The adrenergic innervation of the nasal mucosa of certain mammals. Acta Otolaryngologica 59: 65-72
- (60) Damm M, Quante G, Wolf C, Eckel HE (2001)
 Proteinzusammensetzung und spezifisches IgE in Nasenpolypen von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis. HNO Informationen 2: 73
- (61) Davis AE, Smallman LA (1988) An ultrastructural study of the mucosal surface of the human inferior concha. I. Normal appearances. J Anat 161: 61-71
- (62) Deitmer Th. (1992) Wissenswertes über mukoziliaren Transport. HNO40: 459-463

108
- (63) Delank KW, Keller R, Stoll W (1993) Morphologie und rhinologische Bedeutung der Intumescentia septi nasi anterior. Laryngo Rhino Otol 72: 242-246
- (64) Devillier P, Dessanges JF, Rakotosihanaka F, Ghaem A, Boushey HA, Lockhart A, Marsac J (1988) Nasal response to substance P and methacholine in subjects with and without allergic rhinitis. Eur Respir J 1: 356-361
- (65) Diamant Z, Fokkens WJ (2001) Leukotriene receptor antagonists: clinical potential in allergic rhinitis. Rhinology 39: 187-190
- (66) Drake-Lee AB, Morgan DW (1989) Nasal polyps and sinusitis in children with cystic fibrosis. J Laryngol Otol 103: 753-755
- (67) Durham SR, Till SJ (1998) Immunological changes associated with allergen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 102: 157-164
- (68) Eberle L, Glück U (1994) Klinische Erfahrungen mit lokaler Capsaicinbehandlung bei chronischer Rhinopathie. HNO 42: 665-669
- (69) Edvinsson L, Gulbenkian S, Barroso CP, Cunha E SA M, Polak JM, Mortensen A, Jorgensen L, Jansen-Olesen I (1998) Innervation of the Human Middle Meningeal Artery: Immunohistochemistry, Ultrastructure and Role of Endothelium for Vasomotility. Peptides 19 (7): 1213-1225
- (70) Elwany S, Bumsted R (1987) Ultrastructural Observations on Vasomotor Rhinitis. ORL 49: 199-205
- (71) Elwany S, Hesham Abdel-Moneim M (1997) Carbon dioxide laser turbinectomy. An electron microscopic study. Journal of Laryngol and Otology 111: 931-934

109

- (72) Euler US, Gaddum JH (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J Physiol (London): 74-87
- (73) Fajac I, Braunstein G, Ickovic MR, Lacronique J, Frossard N (1995) Selective recruitment of eosinophils by substance P after repeated allergen exposure in allergic rhinitis. Allergy 50 (12): 970-975
- (74) Fang SY, Shen CL (1998) Neuropeptide innervation and neuroendocrine cells in allergic rhinitis and chronic hypertrophic rhinitis. Clin Exp Allergy 28: 228-232
- (75) Fang SY, Shen CL, Ohyama M (1998) Distribution and Quality of neuroendocrine markers in allergic rhinitis. Acta Otolaryngol (Stockh) 118: 398-403
- (76) Faulk WP, Taylor GM (1971) An immunocolloid method for the electron microscope. Immunochemistry 8: 1081-1083
- (77) Feher E, Burnstock G, Varndell IM, Polak JM (1986) Calcitonin generelated peptide-immunoreactive nerve fibres in the small intestine of the guinea-pig: electron-microscopic immunocytochemistry. Cell Tissue Res 245: 353-358
- (78) Ferner H (1961) Bau und Struktur der Speicheldrüsen unter Berücksichtigung eigener elekronenmikroskopischer Beobachtungen am Menschen. DZZ 16 (3): 128-142
- (79) Fischbach W, Jany B, Nelkenstock R (1986) Bedeutung der neuronenspezifischen Enolase (NSE) in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren. DMW 111: 1721-1725

- (80) Fischer A, Mundel P et al (1993). Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. Neurosci Lett 149: 157-160
- (81) Fischer L, Auberson S, Bretton C, Lacroix JS (1993) Adrenergic and non-adrenergic vasoconstrictor mechanisms in the human nasal mucosa. Rhinology. 31(1): 11-15
- (82) Finger TE, Jeor VLS, Kinnamon JC, Silver WL (1990) Ultrastructure of Substance P-and CGRP- Immunoreactive Nerve Fibers in the Nasal Epithelium of Rodents. Journal of Comparative Neurology 294: 293-305
- (83) Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. Trends Neurosci 14: 60-67
- (84) Gassner HG, Constantinidis J, Steinhart H, Bohlender JE, Iro H (2001)
 Polyposis nasi et sinuum- ist die Erkrankung im Nasenschleim lokalisiert? HNO Informationen 2: 89
- (85) Gawin A, Baraniuk JM, Kaliner M (1993) Effects of Substance P and Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) on guinea pig nasal mucosal secretion in vivo. Acta Otolaryngol (Stockh) 113: 533-539
- (86) Graf P, Hallen H, Juto JE (1995) The pathophysiology and treatment of rhinitis medicamentosa. Clin Otolaryngol 20: 224-229
- (87) Grevers G, Herrmann U (1987) Das Schwellgewebe der Nasenschleimhaut. Laryngo Rhino Otol 66: 152-156
- (88) Grevers G, Herrmann U (1987) Fenestrated endothelia in vessels of the nasal mucosa. An electron microscopic study in the rabbit. Europ Arch Otorhinolaryngol 244: 55-60

- (89) Grevers G, Heinzmann U (1988) Scanning electron microscopic studies of the nasal blood vessels. Arch Otorhinolaryngol 244: 363-366
- (90) Grevers G (1989) Zur funktionellen Morphologie endonasalerBlutkapillaren. Laryngo Rhino Otol 68: 123-28
- (91) Grevers G, Kamargakis WN (1994) Zur Morphologie des endonasalen Schwellgewebes unter besonderer Berücksichtigung muskulärer Polsterbildung. Laryngo Rhino Otol 73: 573-576
- (92) Grevers G, Kamargakis WN (1995) Intravascular smooth muscle fibers and muscular bolsters in nasal swell bodies of humans. Ann Otol Rhinol Laryngol 104: 144-148
- (93) Grevers G, Kastenbauer E (1996) Functional Morphology of Nasal Blood Vessels in Humans. Acta Otolaryngol (Stockh) 116: 312-315
- (94) Grevers G, Kamargakis WN, Welsch U (1996) Morphological variability of smooth muscle cells in human nasal swell bodies. Eur Arch Otorhinolaryngol 253: 147-151
- (95) Grevers G, Sturm C (1997) Die Bedeutung des Gefäßendothels für nasenschleimhaut-spezifische Funktionsabläufe. Laryngo Rhino Otol 76: 398-404
- (96) Grimmelikhuijzen CJP, Westfall JA (1995) The nervous systems of Cnidarians. The nervous systems of invertebrates: An evolutionary and comperative approach. Hrsg. Breidbach und Kutsch Verlag Birkhäuser Basel: 7-24
- (97) Grote JJ, Kujpers W, Huygen PLM (1975) Selective Denervation of the autonomic nerve supply of the nasal mucosa. Acta Otolaryngol 79: 124-132

- (98) Grunditz T, Uddman R, Sundler F (1994) Origin and peptide content of nerve fibers in the nasal mucosa of rats. Anat Embryol (Berl) 189(4): 327-337
- (99) Guarnaccia S, Baraniuk JN, Bellanti J, Duina M (1994) Calcitonin gene-related peptide nasal provocation in humans. Ann Allergy 72: 515-519
- (100) Guesdon J, Ternynck T, Avrameas S (1979) The use of Avidin-Biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal Histochem Cytochem 27 (8): 1131-1139
- (101) Gulbenkian S, Merighi A, Wharton J, Varndell IM, Polak JM (1986) Ultrastructural evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in secretory vesicles of peripheral nerves in the guinea pig. Journal of Neurocytology 15: 535-542
- (102) Gungor A, Baroody FM, Nacerio RM, White SR, Carey JP (1999) Decreased neuropeptide release may play a role in the pathogenesis of nasal polyps. Otolaryngol Head Neck Surg 121 (5): 585-590
- (103) Hällgren R, Venge P (1991) The eosinophils in inflammation. In: Matsson P et al. Clinical impact of the monitoring of allergic inflammation. London Academic Press Ltd: 119-140
- (104) Hanazawa T, Tanaka K, Chiba T, Konno A (1997) Distribution and origin of nitric oxide synthase-containing nerve fibers in human nasal mucosa. Acta Otolaryngol 117(5): 735-737
- (105) Hasegawa M, Kern EG (1978) The effect of breath holding, hyperventilation, and exercise on nasal resistance. Rhinology 16: 243

- (106) Hauser-Kronberger C, Hacker GW, Muss W, Saria A, Albegger K
 (1993) Autonomic and peptidergic innervation of human nasal mucosa.
 Acta Otolaryngol.(Stockh) 113(3): 387-393
- (107) Hauser-Kronberger C, Hacker GW, Albegger K, Dietze O (1994)
 Neuropeptide im oberen Atemtrakt des Menschen. Atemw Lungenkrkh
 20 (2): 96-111
- (108) Heinrich UR, Maurer J, Gosepath K, Mann W (1997). Electron microscopic localization of nitric oxide I synthase in the organ of Corti of the guinea pig. Eur Arch Otorhinolaryngol 254: 396-400
- (109) Heinrich UR, Maurer J, Gosepath K, Mann W (1998) Immunoelectron microscopic localization of nitric oxide synthase III in the guinea pig organ of Corti. Eur Arch Otorhinolaryngol 255: 483-490
- (110) Heppt W (1995) Zytologie der Nasenschleimhaut. Springer, Heidelberg
- (111) Heppt W (1997) Medikamentöse Therapie der allergischen Rhinitis.HNO 45: 647-655
- (112) Heppt W, Cryer A, Trevisani M, Fischer A (2001) Protease Aktiver Receptor-2 (PAR2) in der Nasenschleimhaut. HNO Informationen 2: 105
- (113) Hermann-Kunz E, Thierfelder W (2001) Allergische Rhinitis und Sensibilisierungsraten - Nimmt die Pr\u00e4valenz wirklich zu? Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 7: 643-653
- (114) Heß A, Bloch W, Rocker J, Addicks K, Stennert E, Michel O (1998) In vitro expression of inducible nitric oxide synthase in the nasal mucosa of guinea pigs after incubation with lipopolysaccharides or cytokines. Eur Arch Otorhinolaryngol 255: 448-453

- (115) Heß A, Michel O, Stennert E (1998) NOS-mapping of the nasal mucosa/ detection of nitric oxide (NO) in breath with laser magnetresonance spectroscopy. Allergologie 21: 566-567
- (116) Heß A, Bloch W, Rocker J, Peters S, Stennert E, Addicks K, Michel O (2000) Nachweis von Stickstoffmonoxidsynthasen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in der Nasenschleimhaut. HNO 48: 489-495
- (117) Heym C, Common B, Yin S, Klimaschewski L, Couraud JY, Bachmann S (1993) Neurochemistry, connectivity and plasticity of small intensely fluorescent (SIF) cells in the rat superior cervical ganglion. Ann Anat 175: 309-319
- (118) Hiraide F, Kakoi H (1986) Histochemical study on innervation of glands and blood vessels in nasal polyps. Acta otolaryngol (Suppl) 430: 5-11
- (119) Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B (1975) Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. Science 190: 889-890
- (120) Hökfelt T, Johannsson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M(1980) Peptidergic neurons. Nature 284: 515-521
- (121) Hui Y, Gaffney R, Crysdale WS (1995) Sinusitis in patients with cystic fibrosis. Eur Arch Otorhinolaryngol 252: 191-196
- (122) Hussarek M, Neuhold R (1958) Histochemische Untersuchungsergebnisse an normaler Nasenschleimhaut und bei Rhinitiden. Wiener klinische Woche 70: 678-679
- (123) Hyden H, Lange PW, Larson S (1980) S-100 Glia regulation of GABA transport across nerve cell membrane. J neurol Sci 45: 303-316

- (124) Ichimura K, Mineda A, Seki A (1988) Vascular effects of neuropeptides on nasal mucosa. Ann Otol Laryngol 97: 289-293
- (125) Inanli S, Tutkun A, Batman C, Okar I, Üneri C, Schitoglu MA (2000) The effect of endoscopic sinus surgery on mucociliary activity and healing of maxillary sinus mucosa. Rhinology 38: 120-123
- (126) Irving RM, McMahon R, Clark R, Jones NS (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in severe nasal polyposis. Clin Otolaryngol 22: 519-521
- (127) Ishibe T, Yamashita T, Kumatawa T, Tanaka C (1983) Adrenergic and Cholinergic Receptors in Human Nasal Mucosa in Cases of Nasal Allergy. Arch Otorhinolaryngol 238: 167-173
- (128) Ishii T (1970) The cholinergic innervation of the human nasal mucosa.A histochemical study. Pract Otorhinolaryngol (Basel) 32: 153-158
- (129) Ishii T, Toriyama M (1972) Acetylcholinesterase activity in vasomotor and secretory fibres of the nose. Arch Klin Exp Ohr Nas und Kehlk Heilk 201: 1-10
- (130) Jafek BW (1983) Ultrastructure of human nasal mucosa. Laryngoscope 93: 1576-1599
- (131) Jahnke V (1972) Ultrastruktur der normalen Nasenschleimhaut des Menschen. Z Laryngol Rhinol 51: 30-41
- (132) Jahnke V (1972) Ultrastruktur der normalen und allergischen Nasenschleimhaut. HNO 20 (5): 154-157

- (133) Jahnke V, Theopold HM (1977) Feinstruktur der Nasenschleimhaut bei Mukoviszidose unter besonderer Berücksichtigung der Polyposis. Laryngo Rhinol 56: 773-781
- (134) Jahnke V, Theopold HM, Naumann HH (1977)
 Elektronenmikroskopische Befunde an der menschlichen Nasenschleimhaut bei Störungen des vegetativen Nervensystems. Laryngo Rhinol 56: 959-968
- (135) Jahnke V, Theopold HM (1983) Elektronenmikroskopische Befunde bei allergischen Reaktionen der Nasenschleimhaut. Laryngo-Rhino-Otol.
 62: 603-607
- (136) Jahnke V (1985) Electron microscopy in rhinology. Rhinology 23: 173-179
- (137) Jahnke V (1986) Feinstruktur der menschlichen Nasenschleimhaut bei Allergie und Störungen des vegetativen Nervensystems. Allergologie 5: 211-217
- (138) Jahnke K, Arnold W (1987) Die Bedeutung der Elektronenmikroskopie für Klinik und Forschung in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Anat Anz Jena 163: 63-78
- (139) Jahnke V, Merker HJ (1998) Elektronenmikroskopische Untersuchungen des menschlichen vomeronasalen Organs. HNO 46: 502-506
- (140) Jahnke V, Merker HJ (2000) Electron microscopic and functional aspects of the human vomeronasal organ. American Journal of Rhinology 14: 63-67

- (141) Jeon SY, Majima Y, Kawaguchi S, Sakakura Y, Yasui Y, Nakano K, Ishihara A (1993) Immunohistochemical and electron microscopic studies of Substance P in guinea pig nasal glands. Acta Otolaryngol.Suppl (Stockh) 506: 41-46
- (142) Jeon SY, Kim J, Hwang EG (1997) Origin and distribution of NADPH diaphorase-positive nerves in rat nasal mucosa. Ann Otorhinolaryngol 106(8): 688-692
- (143) Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B (1998) Nasal ciliary beat frequency is age independent. Laryngoscope 108: 1042-1047
- (144) Kahn HJ, Marks A, Thom H, Baumal R (1983) Role of Antibody to S100 Protein in Diagnostic Pathology. Am J Clin Path 79: 341-347
- (145) Kaliner M (1992) The physiology and pathophysiology of the parasympathetic nervous system in nasal disease: An overview. J Allerg Clin Immunol 90:1044-1045
- (146) Kamijo A, Terakawa S, Hisamatsu K (1993) Neurotransmitter-induced exocytosis in goblet and acinar cells of rat nasal mucosa studied by video microscopy. Am J Physiol 265: 200-209
- (147) Kang BH, Chen SS, Jou LS, Weng PK, Wang HW (2000) Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase and 3nitrotyrosine in the nasal mucosa of patients with rhinitis. Eur Arch Otorhinolaryngol 257(5): 242-246
- (148) Karnitzki G, Mlynski G, Mlynski B (1993) Nasale mukoziliare Transportzeit und ziliare Schlagfrequenz bei Gesunden und Sinusitispatienten. Laryngo Rhino Otol 72: 595-598

- (149) Karnovsky MJ, Roots L (1964) A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. J Histochem Cytochem 12: 219-221
- (150) Katahashi T, Kanda T, Hanazawa T, Konno A, Tatsuoka H (1997) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive nerve fiber in the rat nasal mucosa. Auris-Nasus-Larynx 24 (1): 59-64
- (151) Kawamoto H, Takumida M, Takeno S, Watanabe H, Fukushima N, Yajin K (1998) Localization of nitric oxide synthase in human nasal mucosa with nasal allergy. Acta Otolaryngol Suppl 539: 65-70
- (152) Klaassen ABM, van Megen YJB, Kuijpers W, van den Broek P (1988)Autonomic Innervation of the Nasal Mucosa. ORL 50: 32-41
- (153) Knipping St, Riederer A, Fischer A (1995) Immunhistochemische Untersuchungen zur Neuroanatomie der menschlichen Nasenmuschel: Innervationsmuster der seromukösen Drüsen. Laryngo Rhino Otol 74: 81-84
- (154) Knipping St, Holzhausen HJ, Agha-Mir-Salim P, Riederer A, Berghaus A (2000) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Innervation der Drüsen der Nasenschleimhaut des Menschen. Laryngo Rhino Otol 79: 146-150
- (155) Knipping St, Agha-Mir-Salim P, Holzhausen HJ, Berghaus A (2001)
 Immunelektronenmikroskopische Untersuchung bei Rhinitis allergica.
 HNO Informationen 2: 123
- (156) Knipping St, Riederer A, Agha-Mir-Salim P, Holzhausen HJ, Berghaus A (2001) Die klassisch-vegetative, peptiderge und nitrerge Innervation der Drüsen der menschlichen Nasenschleimhaut. Laryngo-Rhino-Otol 80: 697-703

- (157) Knipping St, Holzhausen HJ, Wollschläger B, Agha-Mir-Salim P, Berghaus A (2002) Ultrastrukturelle Veränderungen der Nasenschleimhaut bei der primären ziliaren Dyskinesie. HNO 5: 483-487
- (158) Knipping St, Holzhausen HJ, Agha-Mir-Salim P, Passmann M, Riederer A, Berghaus A (2002) Elektronenmikroskopische Befunde der Nasenund Dünndarmschleimhaut bei der Zystischen Fibrose. Laryngo-Rhino-Otol 81: 93-97
- (159) Knipping St, Holzhausen HJ, Agha-Mir-Salim P, Berghaus A (2002) Chronische Rhinosinusitis bei Hypogammaglobulinämie–eine morphologische Untersuchung.HNO 7 (2002) 644-648
- (160) Knöbber D, Agha-Mir-Salim P, Merker HJ, Jahnke V (1993)
 Intraepitheliale Mastzellen in der Stimmlippen- und Nasenschleimhaut.
 Laryngo Rhino Otol 72: 590-594
- (161) Kohlrausch O (1853) Über das Schwellgewebe an den Muscheln der Nasenschleimhaut. Arch Anat Physiol
- (162) Konno A, Numata T, Terada N, Hanazawa T, Nagata H, Motosugi H
 (1996) Role of substance P in the vascular response of nasal mucosa in nasal allergy. AnnOtol Rhinol Laryngol 105 (8): 648-653
- (163) Körner F (1937) Über Drosselvenen im Schwellgewebe der Nasenschleimhaut. Z mikosk-anat Forsch 41: 131-150
- (164) Kratzing JE (1984) The anatomy and histology of the nasal cavity of the koala. J Anat 138: 35-65
- (165) Krstic RV (1984) Illustrated Encyclopedia of Human Histology.Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York-Tokio

- (166) Kuhn C (1988) Normal anatomy and histology. In: Thurlbeck W (Hrsg)Pathology of the lung. Thieme Medical Publishers Inc, New York: 11
- (167) Kully BM (1945) The use and abuse of nasal vasoconstrictor medication. JAMA 127: 307-310
- (168) Kulkarni AP, Getchell TV, Getchell ML (1994) Neuronal nitric oxide synthase is localized in extrinsic nerves regulating perireceptor processes in the chemosensory nasal mucosae ot rats and human. J Comp Neurol 345: 125-138
- (169) Lacroix JS, Anggard A, Hokfelt T, O'Hare MM, Fahrenkrug J, Lundberg JM (1990) Neuropeptide Y: presence in sympathetic and parasympathetic innervation of the nasal mucosa. Cell Tissue Res. 259(1): 119-128
- (170) Lacroix JS, Buvelot JM, Pampurik J, Lundberg JM (1992)
 Symptomverbesserung bei nicht allergischer Rhinitis durch lokale
 Capsaicinbehandlung. Otorhinolaryngol Nova 2: 248-252
- (171) Lacroix JS, Mosimann B (1996) Attenuation of allergen-evoked nasal responses by local pretreatment with exogenous neuropeptide Y in atopic patients. J Allergy Clin Immunol 98: 611-616
- (172) Laitinen LA, Laitinen A, Panula PA, Partanen M, Tervo K, Tervo T (1983) Immunhistochemical demonstration of Substance P in the lower respiratory tract of the rabbit and not of man. Thorax 38: 531-536
- (173) Laitinen A, Partanen M, Hervonen A, Pelto-Huikko M, Laitinen LA
 (1985) VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract.
 Light and electron microscopic study. Histochemistry 82: 313-319
- (174) Lange W, Unger J (1990) Peptidergic innervation within the prostate gland and seminal vesicle. Urol Res 18: 337-340

- (175) Lantini MS, Proto E, Puxeddu P, Riva A, Testa-Riva A (1990) Fine structure of excretory ducts of human salivary glands. J Submicrosc Cytol Pathol 22: 465-475
- (176) Leonhardt H (1990) Nervengewebe und Nervensystem. In: Leonhardt H, Hrsg. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
 Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag: 234-296
- (177) Lischka FW, Schild D (1994) Effects of nitric oxide upon olfactory receptor neurones in Xenopus laevis. NeuroReport 4: 582-584
- (178) Lundberg JM, Änggard A, Emson T, Fahrenkrug J, Hökfelt T (1981) Vasoactive intestinal polypeptide and cholinergic mechanisma in cat nasal mucosa. Studies on choline acetyltransferase and release of vasoactive intestinal polypeptide. Proc Nat Acad Sci, USA 78: 5255-5259
- (179) Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom SR, Goldstein M (1982) Neuopeptide Y (NPY) like immunoreactivity in peripheral noradrenergic nerves and effects of NPY on sympathetic function. Acta physiol Scand 116: 477-480
- (180) Lundberg JM, Lundblad L, Martling CR, Saria A, Stjärne P (1987)
 Coexistence of Multiple Peptides and Classic Transmitters in Airway
 Neurons: Functional and Pathophysiologic Aspects. Am Rev Respir Dis 136: 16-22
- (181) Lundberg JM, Alving K, Lacroix JS, Matran R (1990) Local and central reflex mechanisms in the neural control of airway microcirculation. Eur Respir J 3 (Suppl12): 624-628
- (182) Lundberg JM, Alving K, Matran R (1991) Pulmonary Physiology and Pharmacology of Neuropeptides. Ann NY Acad SCI: 332-337

- (183) Lundberg JON, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Änggard A, Hökfelt T, Lundberg JM, Alving K (1995) High nitric oxide production in human paranasal sinuses. Nature Medicine 1(4): 370-373
- (184) Lundblad L, Saria A, Lundberg JM, Änggard A (1983) Increased vascular permeability in rat nasal mucosa induced by Substance P and stimulation of capsaicin-sensitive trigeminal neurons. Arch Otolaryngol 96: 479-484
- (185) Lundblad L (1984) Protective reflexes and vascular effects in the nasal mucosa elicited by activation of capsaicin-sensitive substance Pimmunoreactive trigeminal neurons. Acta Physiol Scan Suppl 529: 870-875
- (186) Lung MA, Wang JCC (1989) Autonomic Nervous Control of Nasal Vasculature and Airflow Resistance in the Anaesthetizes Dog. J Physiol 419: 121-139
- (187) Malis DD, Rist B, Nicoucar et al (2000) Modulatory effect of 2 novel CGRP1-receptor antagonists on vasodilatatory responses to exogenous CGRP, histamine, bradykinin and capsaicin in anaestheized pigs. In: Abstract Book XVIII. Congress of European Rhinologic Society Barcelona: 302
- (188) Malis DD, Grouzmann E, Morel DR, Mutter M, Lacroix JS (1999) Influence of TASP-V, a novel neuropeptide Y (NPY) Y2 agonist, on nasal and bronchial responses evoked by histamine in anaesthetized pigs and in humans. Br J Pharmacol 126(4): 989-996
- (189) Malcomson KG (1959) The vasomotor activities of the nasal mucous membrane. J Laryng (London) 73: 73-98

- (190) Malm L (1973) Vasodilatation in the Nasal Mucosa of the Cat and the Effects of Parasympatholytic and β-Adrenergic Blocking Agents. Acta Otolaryngol 76: 277-282
- (191) Malm M, Sundler R, Uddman R (1980) Effects of Vasoactive Intestinal Polypeptide on Resistance and Capacitance Vessels in the Nasal Mucosa. Acta Otolaryngol 90: 304-308
- (192) Markmann HU, Matthus J (1990) Das primäre ziliare Dyskinesiesyndrom. Ultrastrukturelle Beobachtungen bei einem Zwillingspaar. Pathologe 11: 80-84
- (193) Mason DY (1985) Immunocytochemical Labeling of Monoclonal Antibodies by the APAAP Immunoalkaline Phosphatase Technique. In Bullock GR, Petrusz P: Techniques in Immunocytochemistry Academic Press: 25-40
- (194) McGillis J, Organist M, Payan D (1987) Substance P and immunoregulation. Federation Proc 46: 196-199
- (195) McMillan RM, Walker ERH (1991) Designing therapeutically effective5-lipooxygenase inhibitors. Trends Pharmacol Sci 13: 323-330
- (196) Min YG, Shin JS, Choi JS, Chi JG, Yoon CJ (1995) Primary ciliary dyskinesia: Ultrastructural defects and clinical features. Rhinology 33: 189-193
- (197) Minshall E, Ghaffar O, Cameron L, O'Brien F, Quinn H, Rowe-Jones J, Davies RJ, Prior A, Lund VJ, Mackay IS, Nolop K, Lutsky B, Durham SR, Hamid Q (1998) Beurteilung der Langzeitanwendung von Mometasonfuroat Nasenspray (Nasonex) bei der Behandlung der perennialen Rhinitis mittels Nasenschleimhautbiopsie. Otolaryngol Head Neck Surg 118: 648-654

- (198) Mlynski G, Grützenmacher S, Plontke S, Mlynski B, Lang C (2001)
 Correlation of nasal morphology and respiratory function. Rhinology 39: 197-201
- (199) Modin A, Pernow J, Lundberg JM (1991) Evidence for two neuropeptide y receptors mediating vasoconstriction. Eur J Pharmacol 203(2): 165-171
- (200) Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun 19: 739-744
- (201) Mosimann BL, White MV, Hohman RJ, Goldrich MS, Kaulbach HC, Kaliner MA (1993) Substance P, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide increase in nasal secretions after allergen challenge in atopic patients. J Allergy Clin Immunol 92: 95-104
- (202) Mullol J, Raphael GD, Lundgren JD, Baraniuk JN, Merida M, Shelhamer JH, Kaliner MA (1992) Comparison of human nasal mucosal secretion in vivo and in vitro. J Allergy Clin Immunol 89(2): 584-592
- (203) Mullol J, Rieves RD, Baraniuk JN, Lundgren JD, Merida M, Hausfeld JH, Shelhamer JH, Kaliner MA (1992) The effects of neuropeptides on mucous glycoprotein secretion from human nasal mucosa in vitro. Neuropeptides 21(4):231-238
- (204) Mullol J, Baraniuk JN, Logun C, Merida M, Hausfeld J, Shelhamer JH, Kaliner A (1992) M1 and M3 muscarinic antagonists inhibit human nasal glandular secretion in vitro. J Appl Physiol 73 (5): 2069-2073
- (205) Mullol J, Baraniuk JN, Pitale M, Benfield T, Logun C, Picado C, Shelhamer JH (1997) Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces IL-6 and IL-8, but not G-CSF and GM-CSF release from a human brochial epithelial cell line. Neuropeptides 31(2): 119-124

- (206) Munger BL (1963) Histochemical Studies on Seromucous- and Mucous secreting Cells of Human Salivary Gland. Am J Anat 115: 411-430
- (207) Mygind N, Bretlau P (1973) Scanning electron microscopic studies of the human nasal mucosa in normal persons and in patients with perennial rhinitis. Acta Allerg 28: 9-15
- (208) Mygind N, Thomsen J, Jorgensen MB (1974) Ultrastructure of the epithelium in atrophic rhinitis. Acta Otolaryng 77: 439-446
- (209) Mygind N, Bretlau P, Jorgensen MB (1974) Scanning electron microscopic studies of nasal polyps. Acta Otolaryng 78: 436-443
- (210) Mygind N (1978) Nasal allergy. Blackwell Sci Publ, Oxford: 1-353
- (211) Mygind N, Pedersen M. Nielson M (1983) Primary and secondary ciliary dyskinesia. Acta otolaryngol (Stockh) 95: 688-694
- (212) Mygind N (2001) Nasal inflammation and anti-inflammatory treatment.Semantics or clinical reality? Rhinology 39: 61-65
- (213) Nadel JA (1992) Regulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. Am Rev Respir Dis 145: 48-52
- (214) Nagahara T, Matsuda H, Kadota T, Kishida R (1995) Development of substance P immunoreactivity in the mouse vomeronasal organ. Anat Embryol Berl 192 (2): 107-115
- (215) Nagai M, Nagai T, Morimitsu T (1982) Scanning Electron Microscopy of the Nasal Glands and Vessels. Arch Otorhinolaryngol 237: 67-75

- (216) Nieber K, Baumgarten C, Witzel A, Rathsack R, Oehme P, Brunnee T, Kleine-Tebbe J, Kunkel G (1991) The possible role of substance p in the allergic reaction, based on two different provocation models. Int Arch Allergy Appl Immunol 94(1-4): 334-338
- (217) Nielsson T, Cantera L, Edvinsson L (1996) Presence of neuropeptide Y
 Y₁ receptor mediating vasoconstriction in human cerebral arteries.
 Neurosci Lett (204): 145-148
- (218) Nomura Y, Matsuura T (1972) Distribution and clinical significance of the autonomic nervous system in the human nasal mucosa. Acta Otolaryng 73: 493-501
- (219) Norlander T, Nilsson L, Rivero C et al (1997) Effects of experimental Mycoplasma pulmonis infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat. Eur Respir J 10: 2334-2342
- (220) O'Dorisio MS, Wood CL, O'Dorisio TM (1985) Vasoactive Intestinal Peptide and Neuropeptide Modulation of the Immune Response. J Immunol 135: 792-796
- (221) Ogura JH, Harvey JE (1971) Nasopulmonary mechanisms: experimental evidence of the influence of the upper airway upon the lower. Acta Otolaryngol 71: 123-130
- (222) Ohkubo K, Okuda M, Kaliner MA (1994) Immunological localization of neuropeptide-degrading enzymes in the nasal mucosa. Rhinology 31: 130-133
- (223) Ohkubo K, Lee CH, Baraniuk JN, Merida M, Hausfeld JN, Kaliner MA (1994) Angiotensin-converting enzyme in the human nasal mucosa. Am Respir Cell Mol Biol 11: 173-180

- (224) Ohnishi T, Ogura JH, Nelson JR (1971) Effects of nasal obstruction upon the mechanics of the lung in the dog. Laryngoscope 82: 712-715
- (225) Palmer JB, Cuss FM, Mulderry PK, Ghatei MA, Springall DR, Cadieux A, Bloom SR, Polak JM, Barnes PJ (1987) Calcitonin gene–related peptide is localised to human airways nerves and potently constricts human airway smooth muscle. Br J Pharmacol 91 (1): 95-101
- (226) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium – derived relaxing factor. Nature 327: 524-526
- (227) Palmer RJM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endotheliumdependent relaxation. Biochem Biophys Res Comm 153: 1251-1256
- (228) Payan DG, Levine JD, Goetzl EJ (1984) Modulation of Immunity and Hypersensitivity by Sensory Neuropeptides. J Immunol 132: 1601-1604
- (229) Perez VJ, Olney JW, Cicero TJ, Moore BW, Bahn BA (1970) Wallerian Degeneration in Rabbit Optic Nerve: Cellular Localization in the Central Nervous System of the S-100 and 14-3-2 Proteins. J Neurochem 17: 511-519
- (230) Petersson G, Svensjo E (1990) Nasal mucosal permeability after methacholine, substance p, and capsaicin challenge in the rat. Int J Microcirc Clin Exp 9(2): 205-212
- (231) Petersson G, McCaffrey TV, Malm L (1989) Substance P and nasal secretion in dog, rat, and man. Ann Allergy. 62: 410-414

- (232) Petersson G, Bacci E, McDonald DM, Nadel JA (1993) Neurogenic plasma extravasation in the rat nasal mucosa is potentiated by peptidase inhibitors. J Pharmacol Exp Ther 264: 509-514
- (233) Petruson B, Hansson HA (1982) Function and structure of the nasal mucosa after 6 weeks use of nose-drops. Acta Otolaryngol 94: 563-569
- (234) Petruson B, Hansson HA (1987) Nasal mucosa changes in children with frequent infections. Arch Otolaryngol 113: 1294-1300
- (235) Philip G, Togias AG (1995) Nonallergic rhinitis. Pathophysiology and models for study. Eur Arch Otorhinolaryngol 252 (Suppl 1): 27-32
- (236) Piotrowski W, Foreman JC (1986) Some effects of calcitonin generelated peptide in human skin and on histamine release. Br J Dermatol 114: 37-46
- (237) Pollock JS, Nakane M, Buttery LDK, Martinez A, Springall D, Polack JM, Förstermann U, Murad F (1993) Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. Am J Physiol 265: C1379-1387
- (238) Rambotti MG, Saccardi C, Spreca A, Aisa MC, Giambanco I, Donato R (1989) Immunocytochemical Localization of S-100ßß Protein in Olfactory and Supporting Cells of Lamb Olfactory Epithelium. J Histochem Cytochem 37: 1825-1832
- (239) Raphael GD, Jeney EV, Baraniuk JN, Kim I, Meredith SD, Kaliner MA
 (1989) Pathophysiology of Rhinitis. Journal of Clinical Investigation 84: 1528-1535
- (240) Raphael GD, Baraniuk JN, Kaliner MA (1991) How and why the nose runs. J Allergy Clin Immunol 87(2): 457-467

- (241) Reimer A, von Mecklenburg C, Toremalm NG (1979) The mucociliary activity of the upper respiratory tract- III. A functional and morphological study on human and animal material with special reference to maxillary sinus diseases. Acta Oto Laryngologica Suppl 355: 3-20
- (242) Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B, Racke K, Wessler I (1996) Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. Am J Physiol 26: 722-728
- (243) Reiß M (1997) Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie der Polyposis nasi. Wien Klein Wochenschr 109/20: 820-825
- (244) Revington M, Lacroix JS, Potter EK (1997) Sympathetic and parasympathetic interaction in vascular and secretory control of the nasal mucosa in anaesthetized dogs. J Physiol 505 (15): 823-831
- (245) Rha KS, Majima Y, Sakakura Y et al. (1994) Distribution of Substance P immunoreactive nerve fibers in the tracheal submucosal gland of cats. Ann Otol Rhinol Laryngol 103: 222-226
- (246) Riechelmann H (1998) Etagenwechsel und Folgeerkrankungen der allergischen Rhinitis. Laryngo-Rhino-Otol. 77: 646-649
- (247) Riechelmann H, Hafner B, Maurer J, Mann W (1999) Diagnostisches
 Vorgehen bei primärer ziliarer Dyskinesie. Laryngo Rhino Otol 78: 194-199
- (248) Riechelmann H (2000) Therapie der allergischen Rhinitis. HNO-Informationen 4: 1-10

- (249) Riederer A, Knipping St, Fischer A, Grevers G, Zietz Ch (1993) Immunhistochemische Untersuchungen zur Neuroanatomie der Nasenmuschel des Menschen. Innervationsmuster der Gefäße. Laryngo Rhino Otol 73: 51-55
- (250) Riederer A, Knipping St, Fischer A, Unger J (1995) Immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen von "calcitonin gene-related peptide" (CGRP) in der Nasenschleimhaut des Menschen. HNO 43: 724-727
- (251) Riederer A, Knipping St, Fischer A, Unger J (1995) Aktuelle immunhistochemische Ergebnisse zur Lokalisation von vasoaktivintestinalem Polypeptid (VIP) in der Nasenschleimhaut des Menschen. Laryngo Rhino Otol 74: 611-614
- (252) Riederer A, Held B, Wörl J, Unger J (1996) Endogen gebildetes Stickstoffmonoxid in der Nasenschleimhaut des Menschen: Nachweis mittels Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat-Diaphorase (NADPH-d) Histochemie. Laryngo Rhino Otol 75: 584-589
- (253) Riederer A, Fischer A, Knipping St, Unger J, Lange W, Kastenbauer E (1996) Basic innervation pattern and distribution of classic autonomic neurotransmitters in human nasal mucosa vasculature. Laryngoscope 106: 286-291
- (254) Riederer A, Grevers G, Welsch U, Herzmann S (1997) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Gefäßinnervation der Nasenschleimhaut des Menschen. Laryngo Rhino Otol 76: 405-410
- (255) Riederer A, Held B, Mack B (1999) Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung der konstitutiven Stickoxidsynthase in Gefäßendothelien der Nasenschleimhaut des Menschen. Laryngo Rhino Otol 78: 373-377

- (256) Riederer A, Held B, Mayer B, Wörl J (1999) Histochemical and immunocytochemical study of nitric innervation in human nasal mucosa. Ann Otorhinolaryngol 108(9): 869-875
- (257) Rinder J, Lundberg JM (1996) Effects of hCGRP 8-37 and the NK1receptor antagonist SR 140333 on capsaicin-evoked vasodilatation in the pig nasal mucosa in vivo. Acta Physiol Scabd 156: 115-122
- (258) Rinder J (1996) Sensory neuropeptides and Nitric Oxide in nasal vascular regulation. Acta Physiol Scand Suppl 632: 1-45
- (259) Rist B, Lacroix JS, Entzeroth M, Doods HN, Beck-Sickinger A (1999) CGRP 27-37 analogues with high affinity to the CGRP1 receptor show antagonistic properties in a rat flow assay. Regul Pept 79: 153-158
- (260) Rossatti B (1954) Über die Blutzirkulation und die arteriovenösen Anastomosen der menschlichen Nasenschleimhaut. Anat Anz 100: 243-248
- (261) Ruffoli R, Fattori B, Giambelluca MA, Soldani P, Giannessi F (2000) Ultracytochemical localization of the NADPH-d activity in the human nasal respiratory mucosa in vasomotor rhinitis. Laryngoscope 110: 1361-1365
- (262) Rulon JT, Brown H, Logan GB (1963) Nasal polyps and Cystic Fibrosis of the pancreas. Arch Otorhinolaryngol 78: 192-199
- (263) Sakai M, Sawada T, Nishimura T, Nagatsu I (1996) Expression of nitric oxide synthase in the mouse and human nasal mucosa. Cytochem 29: 177-179
- (264) Sano H (1992) Influence of environmental temperature (cold exposure) on nasal resistance. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho 95: 1785-1799

132

(265) Satir P (1974) How cilia move. Scient Am 231: 45

- (266) Sato M, Fukuyama N, Sakai M, Nakazawa H (1998) Increased nitric oxide in nasal lavage fluid and nitrotyrosine formation in nasal mucosaindices for severe perennial nasal allergy. Clinical and Experimental Allergy 28: 597-605
- (267) Schierhorn K, Brunnee T, Schultz KD, Jahnke V, Kunkel G (1995) Substance-p-induced histamine release from human nasal mucosa in vitro. Int Arch Allergy Immunol 107(1-3): 109-114
- (268) Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M (1978) Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. Nature 276: 834-836
- (269) Schwachman H, Kulczycki LL, Mueller HL, Flake CG (1962) Nasal polyposis in patients with cystic fibrosis. Pedriatics 30: 389-401
- (270) Schmidt R, Thews G (1990) Physiologie des Menschen. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 24. Auflage
- (271) Sheppard MN, Kurian SS, Henzen-Logmans SC, Michetti F, Cocchia D et al (1983) Neurone-specific enolase and S-100: new markers for delineating the innervation of the respiratory tract in man and other mammals. Thorax 38: 333-340
- (272) Shibano A, Yoshinori K, Senba E (1998) Histamine-induced internalization of Substance P receptors in myoepithelial cells of the guinea pig nasal glands. Peptides 19 (8): 1365-1371
- (273) Smallman LA (1984) Microtubular abnormalities of cilia in aquired pulmonary diseases. Lancet 1: 965-966

- (274) Somogyi P, Takagi H (1982) A Note of the Use of Picric Acid-Paraformaldehyde- Glutaralehyde Fixative for Correlated Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry. Neuroscience 7: 1779-1783
- (275) Stefansson K, Wollmann RL, Moore BW, Arnason BGW (1982) S-100 protein in human chondrocytes. Nature 295: 63-64
- (276) Stefansson K, Wollmann RL, Moore BW (1982) Distribution of S-100
 Protein outside the Central Nervous Systems. Brain Research 234: 309-317
- (277) Stein H, Gatter K, Asbar H, Mason DY (1985) Use of freeze-dried paraffin-embedded sections of immunhistolgic staining with monoclonal antibodies. Lab Invest 52: 676-683
- (278) Stjärne P, Lundblad L, Änggard A, Hökfeld T, Lundberg JM (1989) Tachykinins and calcitonin gene-related peptide: coexistence in sensory nerves of the nasal mucosa and effects on blood flow. Cell Tissue Res 156: 439-446
- (279) Stjärne P, Lacroix JS, Änggard A, Lundberg JM (1991) Compartment analysis of vascular effects of neuropeptides and capsaicin in the pig nasal mucosa. Acta Physiol Scand 141(3): 335-342
- (280) Stjärne, P (1991) Sensory and motor reflex control of nasal mucosal blood flow and secretion; clinical implications in non-allergic nasal hyperreactivity. Acta Physiol Scand Suppl 600: 1-64
- (281) Stjärne P, Lundblad L, Änggard A, Lundberg JM (1991) Local capsaicin treatment of the nasal mucosa reduces symptoms of nonallergic nasal hyperreactivity. Am J Rhinol 5: 145-151

- (282) Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of proteinprotein interactions. Nature 375: 645-653
- (283) Sundler F, Ekbald E, Grunditz T, Hakanson R, Uddman R (1988) VIP in the peripheral nervous system. Ann NY Acad Sci 527: 143-147
- (284) Sunose H, Zhang W, Ishigaki M, Katori Y, Suzuki M, Ikeda K, Takasaka T, Saito Y, Nishiyama A (1994) Isolation of acini from nasal glands of the guinea-pig. Acta Physiol Scand 151: 377-384
- (285) Tachibana M, Morioka H, Machino M, Tsuruoka T, Tanimura F, Mizukoshi O (1986) Lysozyme producers in nasal mucosa – an immunocytochemical study. Ann Otol Rhinol Laryngol 95: 193-195
- (286) Tanaka Y, Yoshida Y, Hirano M (1995) Precise localization of VIP-, NPY-, and TH-immunoreactivities of cat laryngeal glands. Brain Res Bull 36(3): 219-224
- (287) Tani E, Senba E, Kokumai S, Masuyama K, Ishikawa T, Tohyama M (1990) Histamine application to the nasal mucosa induces release of calcitonin gene-related peptide and substance P from peripheral terminals of trigeminal ganglion: a morphological study in the guinea pig. Neuroscience Letters 112: 1-6
- (288) Tasman AJ, Bogatzki B, Heppt W, Hauser-Kronberger C, Fischer A (1998) Nitric oxide synthase in the innervation of the human nasal mucosa: Correlation with Neuropeptides and Tyrosine Hydroxylase. Laryngoscope 108: 128-133
- (289) Temesrekasi D (1968) Mikroskopischer Bau und Funktion des Schwellgewebes der Nasenmuschel des Menschen. Z mikrosk-anat Forsch 80: 219-227

- (290) Temesrekasi D (1973) Die Nervenelemente der Gefäßmuskulatur des Schwellgewebes der Nasenmuschel des Menschen. Ein Beitrag zur cholinergen-adrenergen Innervation. Z mikrosk anat Forsch Leipzig 87: 170-194
- (291) Terrahe K (1970) Die Drüsen der respiratorischen Nasenschleimhaut. Eine elektronenmikroskopische und histochemische Studie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Veröffentl. Morphol Path 81: 1-86
- (292) Terrahe K (1985) Die hyperreflektorische Rhinopathie. HNO 33: 51-57
- (293) Tonnesen P, Schaffalitzky De Muckadell OB (1987) Substance P and vasoactive intestinal peptide in serotonin-induced nasal secretions in normal subjects. Allergy 42: 146-150
- (294) Tonnesen P, Hindberg I, Schaffalitzky De Muckadell OB, Mygind N
 (1988) Effect of nasal allergen challenge on serotonin, substance P and vasoactive intestinal peptide in plasma and nasal secretions. Allergy 43: 310-317
- (295) Tos M, Poulsen J (1975) Mucous glands in the developing human nose. Arch Otolaryng 101: 367-371
- (296) Tos M, Mogensen C (1977) Nasal glands in nasal allergy. Acta Oto laryngol 83: 498-504
- (297) Tos M, Morgensen C, Thomsen J (1977) Nasal polyps in cystic fibrosis. J Laryngol Otol 91: 827-835
- (298) Tos M, Morgensen C (1977) Mucous glands in nasal polyps. Arch Otolaryngol 103: 407-413

- (299) Toskala E, Nuutinen J, Rautiainen M, Torkkeli T (1995) The correlation of mucociliary transport and scanning electron microscopy of nasal mucosa. Acta Otolaryngol (Stockh)115: 61-65
- (300) Turner PJ, Foreman JC (1999) Hyperresponsiveness in the human nasal airway: new targets for the treatment of allergic airway disease. Mediators Inflamm 8: 133-146
- (301) Uddman R, Alumets J, Densert O, Hakanson R, Sundler F (1978) Occurence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobronchial wall. Acta Otolaryngol 86: 443-448
- (302) Uddman R, Sundler F (1979) Vasoactive Intestinal Polypeptide Nerves in Human Upper Respiratory Tract. ORL 41: 221-226
- (303) Uddman R, Malm L, Sundler F (1983) Substance P-containing nerve fibers in the nasal mucosa. Arch Otorhinolaryngol 238: 9-16
- (304) Uddman R, Luts A, Sundler F (1985) Occurrence and distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the mammalian respiratory tract and middle ear. Cell Tissue Res 241: 551-555
- (305) Uddman R, Cantera L, Cardell LO, Edvinnsson L (1999) Expression of NPY 1 and CGRP 1 receptors in human nasal mucosa: implications in allergic rhinitis. Ann Otol Rhinol Laryngol 108(10): 969-973
- (306) Ueda T, Takumida M, Takeno S, Tashiro T, Kawamoto H, Yajin K. Functional role of nitric oxide in the nasal mucosa of the guinea pig after instillation with lipopolysaccharide. Acta Otolaryngol 2001; 121: 510-516

- (307) Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Robinson DS, Irani A, Schwartz LB, Mackay IS, Kay AB, Durham SR (1992) Immunhistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Am Rev Respir Dis 146: 170-176
- (308) Ventura S, Bavetta S, Milner P, Ralevic V, Burnstock G (1998) Nitric oxide synthase is co-localized with vasoactive intestinal polypeptide in postganglionic parasympathetic nerves innervating the rat vas deferens. Neuroscience 83(2): 607-616
- (309) Vincent SR, Kimura H (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience 46: 755-784
- (310) Widdicombe JG (1986) The physiology of the nose. Clin Chest Med 7: 159-170
- (311) Winther B, Brofeldt S, Christensen B, Mygind N (1984) Light and scanning electron microscopy of nasal biopsy material from patients with naturally acquired common colds. Acta Otolaryngol (Stockh) 97: 309-318
- (312) Wittekindt C, Heß A, Sultani S, Michel O (2001) Immunhistochemische Darstellung von vaskulärem endothelialen Wachsttumsfaktor (VEGF) und dessen Rezeptoren in gesunder Nasenschleimhaut und bei chronischer polypöser Sinusitis. HNO Informationen 2: 208
- (313) Wolf G, Saria A, Gamse R (1987) Neue Aspekte zur autonomen Innervation der menschlichen Nasenschleimhaut. Laryngo Rhino Otol 66: 149-151
- (314) Wolf G, Loidolt D, Saria A, Gamse R (1987) Änderung des nasalen Volumenstromes nach lokaler Applikation des Neuropeptides Substanz-P und von Capsaicin. Laryngo Rhino Otol 66: 412-415

- (315) Wolf G (1988) Neue Aspekte zur Pathogenese und Therapie der hyperreflektorischen Rhinopathie. Laryngo Rhino Otol 67: 438-445
- (316) Wolf G, Anderhuber W, Hauser-Kronberger C, Saria A (1995) Die Behandlung der unspezifischen hyperreflektorischen Rhinopathie (vasomotorischen Rhinitis) mit Capsaicin. Laryngo Rhino Otol 74: 289-293
- (317) Woodhead CJ, Nimmo AJ (1991) Beta adrenoceptors in human nasal mucosa. J Laryngol Otol 105: 632-634
- (318) Woodhead CJ (1994) Neuropeptides in nasal mucosa. Clin Otolaryngol 19: 277-286
- (319) Yamagishi M, Hasegawa S, Takahashi S, Nakano Y, Toshihiko I (1989) Immunohistochemical analysis of the Olfactory Mucosa by Use of Antibodys to Brain Proteins and Cytokeratin. Ann Otol Rhinol Laryngol 89: 384-388
- (320) Yamamoto K (1996) Distribution of neuropeptides in the inferior nasal turbinate mucosa of patients with allergic rhinitis. Nippon-Jibiinkoka-Gakkai-Kaiho 99: 533-543
- (321) Yokoyama R, Inokuchi T, Takahashi Y, Watanabe I (1991) An electron microscopic study of acetylcholinesterase-activity and vasoactive intestinal peptide- and neuro-peptide y-immunoreactivity of the intraepithelial nerve fibers in the nasal gland of the guinea pig. Arch Histol Cytol 54(1): 59-67
- (322) Zaidi M, Moonga BS, Bevis PJR, Bascal ZA, Breimer LA (1990) The Calcitonin Gene Peptides: Biology and Clinical Relevance. Crit Rev Clin Lab Sci 28: 109-174

- (323) Zhang RX (1993) Substance P in plasma of patients with allergic rhinitis and its clinical significance. Chung Hua Erh Pi Yen Hou Ko Tsa Chih 28: 72-73
- (324) Zhao CQ, Tao ZD (1994) An immunocytochemical study on the distrubution of calcitonin gene related peptidergic nerve fibers in rat nasal mucosa. Chin Med J (Engl) 107: 781-784
- (325) Zheng C, Wang Z, Lacroix JS (2000) Effect of intranasal treatment with capsaicin on the recurrence of polyps after polypectomy and ethmoidectomy. Acta Otolaryngol 120: 62-66
- (326) Zuckerkandl E (1884) Das Schwellgewebe der Nasenschleimhaut und deren Beziehungen zum Respirationsspalt. Wien Med Wochenschrift 34: 1121-1126

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

Thesen der Habilitation

Untersuchungen zur Regulation der seromukösen Drüsen der respiratorischen Nasenschleimhaut des Menschen

Habilitation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med. habil.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Stephan Knipping geboren am 10.03.1965 in Merseburg

- Durch histochemische, immunhistochemische, elektronenmikroskopische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen ist eine umfassende Darstellung des Innervationsmusters der seromukösen Drüsen der Nasenschleimhaut des Menschen möglich. Durch Anwendung dieser Verfahren können die Nervenstrukturen genau lokalisiert und den Bestandteilen der Lamina propria mucosae zugeordnet werden.
- 2. Die seromukösen Drüsen, die neben dem Gefäßsystem zu den wesentlichen Bestandteilen der Nasenschleimhaut des Menschen gehören, weisen eine dichte Nervenversorgung auf. Die dargestellten Nervenfasern zeigen eine enge Lagebeziehung zu den Azinuszellen und bilden auch neuroglanduläre Kontaktstellen. Eine hohe Dichte nervaler Strukturen zeigt sich teils korbartig an den Azinuszellen, im Bereich der Drüsenausführungsgänge und im subepithelialen Bindegewebe.
- 3. In den periglandulären Nervenfasern können Neurotransmitter des sympathischen, parasympathischen und sensorischen Nervensystems mit unterschiedlichem Verteilungsmuster identifiziert werden. Es besteht eine Prädominanz von cholinergen Nervenfasern im Gegensatz zum vereinzelten Auftreten von aminergen Nerven im periglandulären Bindegewebe. Das dichte cholinerge Nervenfasernetz an den Drüsenendstücken und im Bereich der Ausführungsgänge deutet auf die dominierende Rolle des parasympathischen Systems im Sinne einer Sekretionssteigerung der Drüsen hin. Die Drüsenfunktionen unterliegen somit einer gemischten cholinerg-aminergen Grundinnervation mit Beteiligung von peptidergen und nitrergen Nervenfasern.
- 4. Neben der klassisch-vegetativen Innervation der Drüsen beteiligen sich auch verschiedene Neuropeptide an der Regulation der Drüsenfunktionen. Die Neuropeptide finden sich in direkter oder unmittelbarer Beziehung zu den Drüsen. Der Nachweis von Vasoaktiv Intestinalem Polypeptid (VIP)haltigen Axonen in unmittelbarer Umgebung der Azinuszellen und an den Ausführungsgängen deutet auf eine direkte Beeinflussung der Sekretproduktion und der Sekrettransportvorgänge durch VIP hin. VIP

kommt hier als Kotransmitter in cholinergen Nerven eine neuromodulatorische Rolle zu. Calcitonin Gene-Related Peptid (CGRP) und Substanz P (SP), die nur vereinzelt in Kontakt zu den Azinuszellen treten, finden sich besonders im subepithelialen Bindegewebe. Als Transmitter in sensorischen Nerven spielen CGRP und SP über Axonreflexe eine wesentliche Rolle bei der "neurogenen Entzündung" und durch direkte Beeinflussung der seromukösen Drüsen. Eine grundlegende Beteiligung der Neuropeptide CGRP und SP besteht bei Patienten mit allergischer und unspezifischer Hyperreaktivität. Der in sympathischen Nervenfasern nachgewiesene Kotransmitter Neuropeptid Y (NPY) ist für die Regulation des Blutflusses und des Blutvolumens in den Austauschund Kapazitätsgefäßen bedeutsam. NPY kann neben einer nervalen Beeinflussung der Drüsenfunktionen auch eine indirekte Regulation der Durchblutung des periglandulären Bindegewebes und damit der Drüsenversorgung bewirken.

- 5. Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt sich auf verschiedene Weise an der Regulation der physiologischen Funktionen der Nasenschleimhaut. Immunreaktive nitrerge Nervenfasern finden sich in Axonen um die seromukösen Drüsen und im Bereich arterieller Gefäße. Besonders im endothelialen Zytoplasma von drüsennahen Kapillaren und Arteriolen zeigt sich eine starke endotheliale NO-Akkumulation. Auch Fibroblasten des Stromas weisen intensive NO-Immunreaktionen auf. NO zeigt als Kotransmitter in parasympathischen Nervenfasern neuromodulatorische und vasodilatatorische Effekt an Gefäßen und stimulierende Wirkungen an seromukösen Drüsen. Endothelial gebildetes NO übt eine relaxierende Wirkung besonders an arteriellen Gefäßen und periglandulären Kapillaren aus. Das Vorkommen von NO an Fibroblasten kann bei strukturellen Veränderungen durch Rhinopathien eine Rolle zu spielen.
- 6. Die Beteiligung verschiedener Neurotransmitter an der Regulation der Drüsenfunktionen, insbesondere der Neuropeptide VIP, CGRP, NPY und SP konnte durch elektronenmikroskopische und immunelektronenmikroskopische Befunde morphologisch bestätigt

werden. Neuropeptide werden gebunden an sogenannten "dense core vesicles" und teilweise in Neurotubuli des Axoplasmas periglandulärer Nerven transportiert. NO wird unabhängig von "dense core vesicles" transportiert.

- 7. Bei ultrastrukturellen Untersuchungen kann die enge Lagebeziehung von Nervenfasern zu den Azinuszellen bzw. Drüsenausführungsgängen gezeigt werden. In direkter Lagebeziehung zu den Drüsenzellen finden sich fast ausschließlich nicht myelinisierte Nervenfasern, während in tieferen Bereichen der Lamina propria mucosae auch myelinisierte Nerven vorkommen.
- 8. Die seromukösen Drüsenzellen der menschlichen Nasenschleimhaut besitzen nur vereinzelt neuroglanduläre Kontaktstellen. Die in Form von nicht myelinisierten Nervenendigungen an den Drüsenzellen darstellbaren neuroglandulären Kontaktstellen weisen zahlreiche "dense core vesicles" auf.
- Auf Grund des nur vereinzelten Auftretens von neuroglandulären Synapsen wird eine vorrangige Übertragung der Transmittersubstanzen "by distance" vermutet. Hierbei gelangen die neurotransmitterhaltigen Vesikel über Bindegewebsspalten an die Effektorzellen.
- 10. Im periglandulären Bindegewebe lassen sich regelmäßig fenestrierte Kapillaren nachweisen. In deren unmittelbarer Umgebung finden sich morphologisch keine Axone und somit kein Anzeichen für eine direkte nervale Kontrolle des kapillären Gefäßtonus. Eine Regulation des Gefäßtonus und damit auch der periglandulären, kapillären Durchblutung wird hier den drüsennahen Arteriolen, die einer Kontrolle durch sympathische, NPY- und NO-haltige Nerven unterliegen, und den postkapillären Polstervenen zugesprochen. Durch eine Zunahme des intrakapillären Gefäßdruckes, bedingt durch arterioläre Vasodilatation kann es zur vermehrten Plasmaexsudation und damit zu einem vermehrten
Substratangebot für die Drüsen kommen. Eine vaskulär bedingte Modulation und Regulation der Drüsenfunktionen ist anzunehmen.

- 11. Drüsenausführungsgänge zeigen das gleiche Innervations- und Vaskularisationsmuster wie die Azinuszellen. Somit scheint auch eine nervale Kontrolle von Transport- und Austauschvorgängen im Ausführungsgangsystem vorzuliegen.
- 12. Die häufig auftretenden hyperreaktiven Rhinopathien zeigen morphologische Besonderheiten mit Veränderung der Drüsenstrukturen. An den pathophysiologischen Prozessen sind einige vasoaktive und sekretionsregulierende Neuropeptide beteiligt. Insbesondere spielen die Neuropeptide CGRP und SP bei der Entstehung einer "neurogenen Entzündung" bei der spezifischen (allergischen) und unspezifischen nasalen Hyperreaktivität eine entscheidende Rolle.
- 13. Der morphologische Nachweis der Beteiligung verschiedener Neurotransmitter an hyperreaktiven Rhinopathien bildet die Grundlage für die zukünftige Entwicklung geeigneter Inhibitoren bzw. Antagonisten. Eine Hyposensibilisierung sensorischer Neurone durch Capsaicin, der protrahierte Neuropeptidabbau durch Endopeptidasen, die Blockade von Neuropeptid-Rezeptoren mit spezifischen Antagonisten und die Hemmung der NO-Synthese durch L-Arginin-Analoga stellen mögliche Interventionsmöglichkeiten dar. Weitere Untersuchungen zur genauen Lokalisation von sekretionsmodulierenden vasoaktiven und Neurotransmittern im Bereich des mittleren Nasengangs und in Nasenpolypen sind zur weiteren Abklärung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in der Nasenschleimhaut des Menschen vorgesehen.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus danke ich für die kontinuierliche Unterstützung bei meiner Ausbildung zum Facharzt für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und für die Überlassung des Themas für diese Forschungsarbeit. Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bedanke ich mich für die mir entgegengebrachte Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen möchte ich mich besonders für die langjährige intensive Zusammenarbeit, die permanente Unterstützung bei der Lösung der aufgetretenen Probleme und für die Ermöglichung der Arbeit mit dem Transmissionselektronenmikroskop bedanken.

Herr PD Dr. med. Andreas Riederer hat mir den Weg zur Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde geöffnet und mich von Anfang an während meiner Ausbildung und bei den Forschungsvorhaben unterstützt. Für seinen fachlichen und persönlichen Beistand bin ich ihm besonders dankbar.

Herr PD Dr. med. Parwis Agha-Mir-Salim und Herr PD Dr. med. Marc Bloching haben einen wesentlichen Anteil an meiner fachlichen Ausbildung geleistet und standen mir jederzeit in allen Fragen zur Seite. Durch Ihre Anregungen und Unterstützung haben sie einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet.

Den Mitarbeiterinnen des elektronenmikroskopischen Labors des Pathologischen Institutes, Frau Claudia Fischer und Frau Gudrun Senze sowie den Mitarbeiterinnen des HNO-Forschungslabors, Frau Otilie Pietz, Frau Tina Große und Frau Elke Wolfsteller danke ich herzlich für Ihr Engagement bei der Durchführung der Versuchsreihen.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die Bereitstellung einer Sachbeihilfe, die Bezahlung einer MTA-Stelle und für die weitere Förderung eines Folgeprojektes bedanken.

Meiner Frau, Ines Rolle bin ich besonders für ihr Verständnis und ihre permanente Unterstützung dankbar. Ohne ihre Hilfe wäre die Durchführung des Forschungsprojektes und die Fertigstellung dieser Schrift nicht möglich gewesen.

11. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Knipping, Stephan Dr.med.
<u>Geburtsdatum:</u>	10.03.1965
<u>Geburtsort</u> :	Merseburg
Familienstand:	ledig, 1 Tochter
<u>Eltern:</u>	Dr. med. Joachim Knipping, Chirurg Melitta Knipping, Op- und Krankenschwester
Wohnort:	Herderstaße 13 06114 Halle/Saale
Schulausbildung	
1971-1979 1979-1983	Grundschule, Merseburg Gymnasium, Merseburg, Abschluß: Abitur
Ausbildung	
1983-1986	Krankenpfleger, Kreiskrankenhaus Merseburg
Hochschulausbildung	
1986-1989	Studium der Humanmedizin an der Martin-

Studium der Humanmedizin an der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians- Universität München

Beruflicher Werdegang

11/1994-05/1995	AIP an der HNO-Klinik der LMU-München	
07/1995-06/1996	AIP an der HNO-Klinik der MLU-Halle-Wittenberg	
seit 06/1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an de	er
	Universitätsklinik und Poliklinik für HNO)_
	Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie der MLU-Halle	;-
	Wittenberg	
seit 09/2000	Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde	

Halle im Juli 2002