

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Methodik

#### 4.1.1 NADPH-Diaphorase-Histochemie und Immunzytochemie

Um ein Verständnis der Innervation des peripheren Nervensystems durch NO zu erlangen ist es notwendig, das synthetisierende Enzym im histologischen Präparat exakt und zweifelsfrei zu markieren. Eine ideale Methode müsste einen absoluten Nullwert besitzen, bei dessen Überschreiten ein positives, spezifisches Signal gemessen wird und daher ein positives Ergebnis von einem negativen eindeutig unterschieden werden kann. Diesen Ansprüchen genügt jedoch keine der bekannten Methoden um ein Enzym im histologischen Präparat zu markieren. Zumeist steht für den Nachweis von Enzymen im Nervensystem lediglich die Immunzytochemie zur Verfügung. Es ist als ein glücklicher Umstand anzusehen, dass mit der NADPH-Diaphorase zusätzlich eine sehr robuste enzymhistochemische Methode zur Lokalisation der Stickoxidsynthase vorliegt. Daher lassen sich diejenigen Signale, die sowohl immunzytochemisch als auch enzymhistochemisch gewonnen werden, als mit grosser Sicherheit spezifisch für NOS ansehen.

Um störende Autofluoreszenzen auszuschalten und dauerhafte Präparate zu erhalten, wurde auch die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP) zum Nachweis des primären Antikörpers angewendet. In zwei durchgeführten Untersuchungsreihen erzielte die PAP die gleichen positiven Markierungen wie sie auch in der indirekten Fluoreszenz-Technik gefunden wurden. Da der Nachweis der Peroxidase durch Oxidation von Diaminobenzidin zu einem braunen Reaktionsprodukt führt, das bei Doppelmarkierung durch das dunkelblauschwarze Formazan aus der NADPHd-Reaktion überlagert wird, ist die PAP nicht die Methode der Wahl für die direkte Kolokalisation von immun- und enzymhistochemischer Reaktion für NOS. Daher wurde in den meisten Experimenten die Immunfluoreszenz mit anschliessender NADPHd statt der PAP angewendet.

Im Grunde geht die Methode zum histochemischen Nachweis von NOS auf die Histochemie der Dehydrogenasen zurück. Im Rahmen einer solchen Studie fanden Thomas und Pearse schon 1961 an unfixierten Gefrierschnitten des ZNS, dass es infolge der Reduktion des synthetischen Chromogens Nitroblau-Tetrazolium in Gegenwart von NADPH zur Darstellung von "solitary active cells" kam. 1983 nutzten Scherer-Singler et al. die NADPH-Diaphorase (NADPHd), um deren Verteilungsmuster im Rattenhirn zu beschreiben. In diesen Versuchen wurden formaldehyd- und glutaraldehydfixierte Gewebe untersucht. Die Autoren beschrieben folgerichtig die gefundene NADPHd als formaldehyd- und glutaraldehydresistent.

Hope et al. (1991) konnten nachweisen, dass in Homogenaten aus Rattenhirn in verschiedenen chromatographischen Verfahren die NADPH-Diaphorase-Aktivität mit der NOS-Aktivität komigriert, schlossen daraufhin auf eine molekulare Identität beider Aktivitäten und etablierten damit die NADPHd als eine histochemische Markierungsmöglichkeit für NOS. Auch Dawson et al. (1991) stellten nach Kolo-kalisation von NADPHd und mRNA der Stickoxidsynthase eine Identität der NADPH-Diaphorase mit der neuronalen NOS fest. Matsumoto et. al (1993) wiesen daraufhin, dass erst durch die Aldehyd-Fixierung NADPH-Diaphorase zu einem spezifischen Marker für NOS wird, da ohne diese eine unbestimmte Menge anderer Enzyme auch NADPHd-Aktivität aufweist. Es folgte eine Vielzahl von Publikationen zur Lokalisation von NOS mittels NADPHd, da das Interesse an Funktion, Lokalisation und Kolo-kalisation mit anderen biologischen Mediatoren groß war, die Markierung durch Nitroblau-Tetrazolium einfach durchführbar ist und zu präzisen Darstellungen im histologischen Präparat führt. Kaum jemand setzte sich in diesen Studien mit der Spezifität der Methode auseinander.

Nicht unerwartet stellten unabhängig von einander Brüning et al. (1994b,c) und Holmqvist et al. (1994) in Experimenten, die die NADPHd und NOS-Immunzytochemie in Kolo-kalisation benutzten, differierende Markierungen fest. Es wurde in einigen Fällen zu den entsprechenden Diaphorase-Markierungen keine Immunreaktivität gefunden. Demzufolge sollte eine alleinige NADPHd als unspezifisch gelten. Als Ursache dieser Unspezifität

kommen viele Erklärungen in Betracht. Eine nicht enzymatische Umwandlung von Nitroblau-Tetrazolium bei zu langer Inkubationszeit führte in eigenen Untersuchungen zu einer Hintergrundfärbung, die sich je nach Gewebeaufbau und trotz Waschschrinen darstellte. Da es sich bei der Diaphorase um eine Reaktion mit einem synthetischen Stoff, also nicht um einen physiologischen Prozess, sondern vielmehr um einen Nebeneffekt handelt, ist es leicht vorstellbar, dass dieser auch an anderen Enzymen vollziehbar ist. An unterschiedlichen Geweben konnte demonstriert werden, dass die alkalische Phosphatase in Verbindung mit einer NADH-Diaphorase die NADPH-Diaphorase-Aktivität imitieren kann (Brüning 1995a, Grozdanovic und Gossrau 1995a).

So wurde in eigenen Experimenten zum Ausschluss einer NADH-vermittelten Reaktion in drei Untersuchungsreihen ausgewählten Gewebepräparationen der Reaktionslösung 5 mmol/l eines Hemmstoff der alkalischen Phosphatase (Levamisol) beigefügt. Das Enzym spaltet den Phosphatanteil des in der Reaktion zu dem Chromogen Nitroblau-Tetrazoliums nötigen NADPHs zu NADH und würde das Produkt der NADH-Diaphorase nachweisen. Mit Levamisol als Inhibitor der alkalischen Phosphatase präinkubierte oder der NADPH-Nitroblau-Tetrazolium-Lösung zugesetztes Levamisol führte jedoch nicht zu differierenden Markierungen.

Mit Nitroarginin, einem kompetitiven Hemmstoff der Stickoxid-Synthase, präinkubierte Gewebepräparationen, die der NADPH-Histochemie zugeführt wurden, zeigten in eigenen Untersuchungen keine Unterdrückung der Diaphorase-Aktivität. Dies erscheint zunächst überraschend, ist aber erklärbar durch die Überlegung, dass für die Oxidation des Tetrazoliums nicht die Bindung des Substrates Arginin, sondern diejenigen Teile des Enzyms notwendig sind, die an der Elektronenübertragung beteiligt sind, insbesondere die Flavinnukleotide FAD und FMN. Es sei allerdings vermerkt, dass andere Autoren eine Inhibition der NADPH-Diaphorase-Reaktion durch Nitroarginin beschrieben (Blottner und Baumgarten, 1992).

In der vorliegenden Arbeit sind zwar alle neuronalen Strukturen immunzytochemisch und histochemisch übereinstimmend markiert, jedoch zeigt das Steroidhormon produzierende

Gewebe der Nebennieren deutlich eine alleinige NADPHd-Diaphorase-Aktivität, die vermutlich das Produkt eines anderen als des NO-Enzyms ist und als nicht spezifisch für die Stickoxidsynthase gelten kann.

Da sich die Untersuchungen auf die neuronale NOS (NOS I) beziehen und der polyklonale Antikörper gegen diese gerichtet ist, könnte eine fehlende Immunreaktivität auch in einer Untergruppe der Isoform begründet sein. Auf der anderen Seite können auch nicht-neuronale Strukturen aufgrund einer Kreuzreaktivität mit der neuronalen NOS immunologisch markiert sein. In der vorliegenden Arbeit stellten sich Nierenepithelien, Teile der Harder'schen Drüse und der Tränendrüse, die Epithelien von Trachea, Bronchien, Oviduct sowie die Leydig'schen Zwischenzellen in Übereinstimmung beider Methoden positiv markiert dar. Mit Ausnahme der beiden Orbitaldrüsen liess sich jedoch in der Immunreaktion ein schwächeres Signal ausmachen. Dies stellt ein Indiz für eine eher unspezifische bzw. kreuzreagierende Markierung dar. Da es sich um eine Reaktivität in beiden Methoden handelt, liegt vermutlich die Isoform NOS vor.

Der im Kaninchen gebildete Antikörper, der gegen Schweine-Zerebellum gerichtet ist, stellt im Experiment an Schildkröten einen heterologen Antikörper dar. Ohne genauere molekularbiologische Kenntnisse der strukturellen Verhältnisse der phylogenetisch weit entfernten Spezies bezüglich ihrer NOS ist die Spezifität des Antiserums im Experiment an Schildkröten zwar nicht sicher, jedoch erwies sich das Antiserum bereits in Untersuchungen an anderen Spezies - Maus, Meerschweinchen (Grozdanovic et al. 1992), Huhn (Brüning et al. 1994b), Goldfisch (Brüning et al. 1995b) und in Untersuchungen zum ZNS der Schildkröte (Brüning et al. 1994d) - als zuverlässiger Marker. Allein der Umstand, dass in diesen evolutionär weit von einander entfernten Gattungen ein Antiserum als spezifisch gilt und in vielen Organsystemen wiederzufinden ist, lässt erkennen, wie phylogenetisch früh und primär konservativ sich die Entwicklung der NO-Synthase vollzogen haben muss. In Vorversuchen an *Trachemys scripta elegans* mit NOS-abgesättigtem Antiserum wurden keine durch Antikörpermarkierung erzeugten Signale mehr festgestellt. Dieses spricht für eine vollständig absättigende Bindung des NOS-Antikörpers an das zugefügte Enzym und indirekt für eine

hohe Spezifität bei gebundenen markierten Strukturen in den immunzytochemischen Experimenten.

Auf der anderen Seite könnten die diskrepanten Ergebnisse von Immunmarkierung und Histochemie eine Frage der Sensitivität sein, d.h. in einigen Fällen könnte das Fluoreszenz-Signal aufgrund der geringen Anzahl von NOS-Bindungsstellen schlicht übersehen werden, während die sich wiederholende Diaphorase-Reaktion eine deutliche Markierung erkennen lässt.

#### 4.2 Lokalisation von NO-Synthase im peripheren Nervensystem

Während in den oberen sympathischen Ganglien lediglich vereinzelt NOS markierte Zellen beschrieben wurden, enthalten parasympathische und sensorische Ganglien stets Subpopulationen von nitrergen Neuronen. Dieses nNOS-Verteilungsmuster ist nicht auf Reptilien wie Schildkröten beschränkt, sondern scheint ein spezieübergreifendes, auch in Säugern wie Maus oder Ratte vorliegendes Verteilungsmuster zu sein.

Darüber hinaus ist innerhalb des gesamten Magen-Darmtrakts eine beträchtliche Anzahl neuronaler Markierungen zu finden. Die nNOS ist im Gastrointestinaltrakt vor allem im Plexus myentericus und submucosus lokalisiert. In histologischen und pharmakologischen Studien wie auch durch die Untersuchungen an transgenen NOS-I- knockout Mäusen (Huang et al. 1993) konnte gezeigt werden, dass die neuronale Stickoxidsynthase wenigstens einer der wichtigsten von Burnstock geforderten inhibierenden NANC-Transmitter ist. Die genmanipulierten Mäuse zeigten als morphologische Aberration eine hypertrophierte Ringmuskulatur, die im Bereich des Pylorus besonders evident wurde.

Da die Ganglien in vielen Abschnitten der Eingeweide so wie im Herz und im Becken sowohl sympathische als auch parasympathische Anteile besitzen, stellt sich hier eine besondere Situation dar. Um die Einteilung der gefundenen Neurone vornehmen zu können, ist neben makro- und mikroskopischer Untersuchung auch die Bestimmung der in den

Neuronen enthaltenen Neurotransmitter (inzwischen über 50 bekannte Moleküle) dienlich. Von ihnen sind inzwischen einige als Markersubstanzen etabliert. Zwischen prä- und postganglionären parasymphatischen wie symphatischen Neuronen sowie postganglionär parasymphatisch dient folglich Azetylcholin bzw. das synthetisierende Enzym, die Azetylcholinesterase (ChAT), als Markersubstanz.

In cholinergen postganglionären Neuronen fand sich vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Histidin-Isoleucin-Peptid (PHI). In postganglionären symphatischen Nerven werden Noradrenalin und verschiedene Neuropeptide gebildet. Immunreaktivität für Tyrosin-Hydroxylase (TH) und auch Neuropeptid Y (NP Y) kann als Marker für diesen Teil des PNS fungieren können. Enkephalin (ENK), Neurentensin (NT), Substanz P (SP) und Somatostatin (SOM) gelten als Marker in präganglionären symphatischen Neuronen (nach Übersicht von Lindh et al. 1990). Spinale und kraniale vzeroafferente Neurone enthalten z.B. SP und Calcitonin-gene-related peptide (CGRP). Da aber einzelne oder auch Gruppen symphatischer wie parasymphatischer Neurone oder Nervenfasern auch keine der üblichen Markersubstanzen oder ungewöhnliche Kombinationen enthalten können, sind dieser Methodik deutliche Grenzen gesetzt. Sie muss durch weiterführende anatomische, physiologische wie pharmakologische Untersuchungen ergänzt werden. Für einen relativ neu bekannten Neurotransmitter ist es um so notwendiger, ihn im Zusammenhang mit anderen “klassischen” Transmittern und Neuropeptiden zu betrachten.

Die vorliegende Arbeit liegt im Forschungsbereich der vergleichenden Histochemie. Nicht nur in Ermangelung ausreichend gesunden menschlichen Untersuchungsmaterials, sondern auch praktischen wie phylogenetischen Aspekten folgend, nutzt die Studie die Schildkröte *Trachemys scripta elegans* als Tiermodell. Die der Ratte vergleichbare Grösse der adulten Reptilien stellt eine übersichtliche und vollständige Untersuchung der Organe sicher, die durch das PNS versorgt werden. In der stammesgeschichtlichen Entwicklung gelten Reptilien als gemeinsame Vorläufer von Vögeln und Säugern, d.h. ihre Existenz reicht zurück in die Zeit vor der Aufspaltung der Spezies der Vögel und Säuger; und besonders Schildkröten gelten nach herkömmlicher Auffassung als nächste Abkömmlinge der

Vorläuferreptilien (Cruce et al. 1974; Powers et al. 1980). Demzufolge sprechen die erhobenen Befunde für eine schon früh in der Evolution etablierte nitrege Innervation im PNS bei Amnioten.

#### 4.2.1 Kopfganglien, Schilddrüse, Thymus

NOS findet sich in unterschiedlichen Halsganglien. In *Trachemys scripta elegans* erscheint nur ein geringer Anteil des Ganglion ciliare spezifisch markiert. Dies steht wiederum in Einklang mit Befunden von Säugetieren. In Untersuchungen an Affen und Katzen (Sun et al. 1994) werden ebenfalls Minoritäten von etwa 2% der Ganglienzellen als nitrege beschrieben. Yamamoto et al. (1993) stellten im peripheren Augengewebe wie auch in Ziliarganglion und Retina der Ratte Unterschiede in der Markierung mit NADPHd (“somewhat more extensive localizations”) und NOS-Immunhistochemie fest.

Auch in diesen Untersuchungen entsteht die Vermutung, dass lediglich eine starke bzw. deutliche Nitroblau-Tetrazolium-Färbung durch NADPHd entstanden ist und mit der NOS-Antikörpermarkierung korreliert, während wohl eine schwache Diaphorase-Reaktivität als unspezifisch gelten könnte. Santer & Symons (1993) formulierten entsprechend die Überlegung, dass ausschließlich intensiv NADPHd-positive Neurone NOS synthetisieren.

Im Ganglion palatinum von *Trachemys scripta elegans* sind im Gegensatz zum Ganglion ciliare alle Ganglienzellen spezifisch markiert. In Säugern wie Ratte (Ceccatelli et al. 1992, Morris et al. 1993, Yamamoto et al. 1993, Minami et al. 1994) Hund (Toda et al. 1993) und Affe (Yoshida et al. 1994) sind im entsprechenden Ganglion sphenopalatinum zwar NOS-positive Anteile von 70 %, aber auch bis 95% beschrieben, somit ist zur generellen Verteilung bei Vertebraten zumindest übereinstimmend ein sehr hoher Prozentsatz positiver Markierungen in diesem parasymphatischen Kopfganglion zu konstatieren.

Ausgehend von spezifisch markierten Neuronen dieses Ganglions konnten Nervenfasern bis zu den Nasendrüsen verfolgt werden (Hanazawa et al. 1993). Auch das

Vomeronasal-Organ (Matusuda et al. 1996) scheint von den nitrergen Neuronen des Ganglions innerviert zu sein. In der NOS-Immunfluoreszenz-Technik konnte entlang von Blutgefäßen und um Drüsen im Schwellkörper, nicht aber in den rezeptorfreen Bezirken des Organs NOS-Reaktivität detektiert werden. Im Ganglion sphenopalatinum kolokalisierte NOS stets mit dem vasoactiven intestinalen Peptid (VIP), lediglich einzelne Neurone zeigten in der Doppelmarkierungsstudie ausschließliche NOS-Positivität. Die beiden Neurotransmitter könnten sowohl eine Modulation des Gefäßtonus, als auch die Steuerung der Drüsensekretion übernehmen.

NOS-markierte Nervenfasern des Ganglion pterygopalatinum erreichen nicht nur Nasendrüsen und Vomeronasalorgan, sondern auch das Auge. In der Retina, Choroidea und entlang der Blutgefäße des Limbus der Ratte konnten spezifische NOS-Markierungen lokalisiert werden (Yamamoto et al. 1993). In der Ente wurde neben der nNOS/VIP Koexpression im Ganglion pterygopalatinum eine Übereinstimmung von ca. 30% mit einer nNOS/VIP/Galanin(GAL)-Koexpression gefunden (Schrodl et al. 2000). Die Substanzen könnten in einem "local network" als Neurotransmitter den Tonus der glatten Muskelfasern steuern und den intraocularen Druck, die Weite der Choroidea sowie die Akkommodation regulieren.

In enger Assoziation zu Axonen der Meibom'schen (tarsalen) Drüsen beim Affen, konnten spezifische nNOS-Signale detektiert werden (Kirch et al. 1996). Neben NOS und Dopamin-beta-Hydroxylase (DBH), VIP, Substanz P (SP), Neuropeptid Y (NP Y), Tyrosin Hydroxylase (TH), Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP 9.5) fand sich das Calcitonin-gene-related Peptid (CGRP). VIP und NOS/NADPHd-Markierungen machten den Hauptanteil aus. Hier zeigt sich eine bemerkenswert hohe Präsenz der NO-Synthase nicht nur in den Nervenzellkörpern des Ganglion pterygopalatinum, sondern auch in den peripher gelegenen Nervenfasern.

Das Vorkommen NOS-haltiger Neurone in sensorischen Ganglienzellen konnte aufgrund von NADPHd-Experimenten am Trigemini-Ganglion der Ratte (Aimi et al. 1991) vermutet werden. Nozaki et al. (1993) dokumentierten vereinzelte NOS-Immunreaktivität

(NOS-IR) in den opthalmischen Bezirken des Ganglions und, im Gegensatz zum Ganglion pterygopalatinum, keine Kollokationen zu CGRP. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen wie auch Jiang und Terashima (1996) dehnen diese positiven Befunde auf niedrigere Vertebraten aus. Die Lokalisation der spezifisch markierten Nervenzellen in *Trachemys scripta elegans* ist zwar ebenfalls gehäuft im ventralen Abschnitt des Ganglions, aber vor allem am Ort der Entstehung aller drei Hauptäste zu finden. Im Trigeminus-Ganglion der Schlange *Trimeresurus flavoviridis* wurde ebenfalls eine Subpopulation nitrerger Neurone gefunden (Jiang and Terashima 1996).

Aufgrund von immunhistochemischen und in situ Hybridisierungs-Ergebnissen konnten Zhang et al. (1996) die Expression von Peptiden, NOS und NP Y-Rezeptoren im Ganglion trigeminale ohne periphere Axotomie und nach peripherer Axotomie darstellen. Besonders auffällig ist der Anstieg von NP Y mRNA-positiven Neuronen von ca. 5% auf 54%. VIP mRNA-Markierungen stiegen von 7% auf 31%, NOS mRNA von 4% auf 22% und GAL von 11% auf 34%. Wenn auch die Interaktionen der beschriebenen Mediatoren weder im unversehrten Zustand noch im verletzten Gewebe verstanden sind, so lässt sich doch neben der physiologisch intakten Situation mit einer im PNS oft gefundenen Kollokation von VIP und NOS sowie eine bemerkenswerte Kinetik mit angestiegenem und nicht etwa verminderten Mediatoren-Nachweis schon jetzt festhalten.

Während NOS und CGRP in sensorischen Ganglienzellen wie den Spinalganglien (besonders in thorakalen und lumbalen Ganglien) oft kollokalisiert sind (Aimi et al. 1991, Papka et al. 1992), stellten Nozaki et al. (1993) im Trigeminus-Ganglion keine CGRP-Markierungen fest.

Um die Herkunft der NO-Innervation der posterioren zerebralen Blutversorgung nachvollziehen zu können, kombinierten Kadota et al. (1996) NOS-Immunhistochemie und retrograde Fluro-Gold-Darstellung. Die Arteria basilaris der Ratte zeigte zahlreiche positive Signale für beide Parameter im Ganglion sphenopalatinum und oticum, weniger zahlreiche im Ganglion trigeminale und nodosum und in spinalen Ganglien. Keine NOS-IR wurde im Ganglion cervicale superius festgestellt. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass NOS-haltige

Nervenfasern in Blutgefäßen des ZNS multipler Herkunft sind und parasymphatische wie sensorische NOS-haltige Ganglien eine bedeutende Rolle auch in der Steuerung der kranialen Durchblutung besitzen.

Zur nitrengen Innervation der Schilddrüse liegen nur wenige Arbeiten vor. In der Schildkröte konnten keine spezifischen Markierungen gefunden werden. Lediglich eine Arbeit von Syed et al. (1994) beschreibt in NADPHd-Technik positive neuronale Zellkörper und Nervenfasern, meist in der Schilddrüsenkapsel, im follikulären Bindegewebe, perivascular gelegen, bei Huhn und Maus.

Auch zum nNOS-Vorkommen im Thymus ist wenig bekannt. In *Trachemys scripta elegans* waren keine spezifischen Signale festzustellen. Einzig bemerkenswert erscheinen Ergebnisse von Gulati et al. (1997), die NADPHd und VIP in Kolokalisation aufweisend "neuron-like cells" im Thymus-Bindegewebe des Huhns fanden. Zur Bestimmung der neuronalen Herkunft dieser Strukturen wurde die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) bestimmt. Insgesamt scheint in der Schilddrüse wie im Thymus die neuronale NOS-Innervation keine oder lediglich eine geringe Bedeutung zu haben.

#### 4.2.2 Herz

Subpopulationen von nitrengen Neuronen sind in den Ganglienzellen und Nervenfasern des Herzens verschiedener Spezies gefunden worden. Klimaschewski et al. (1992) beschrieben bei Meerschweinchen und Ratte kardiale Ganglienzellen und Nervenfasern, die sinuatriale and atrioventrikuläre Knoten und das Myokard sowie lokale Neurone in der Umgebung von Koronararterien und pulmonalen Gefäßen innervieren.

Tanaka et al. (1993) ergänzten dies um septale intratriale und und kavale Vorkommen. Auch bei Nicht-Säugetern wie Frosch und Goldfisch (Clark et al. 1994; Brüning et al. 1996a,b) konnten, wie bei der Schildkröte, intrakardiale bzw. sinuatriale nitrege Ganglienzellen lokalisiert werden. In elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden eine ungleichmäßige

Verteilung der nNOS-IR Neurone sowie synaptische Verbindungen zu spezifisch markierten wie nicht-markierten Nervenzellen gesehen (Sosunov et al. 1996).

Steele et al. (1994) differenzierten in Ganglienzellen des Meerschweinchens eine Vielzahl unterschiedlicher neuronaler Mediatoren (Kombinationen immunreaktiver Markierungen für Dynorphin B, Substance P, Neuropeptide Y and NOS; einige kleinere Subpopulationen enthielten keine Somatostatin-IR, aber VIP, NP Y, Dynorphin B, SP und NOS). Aufgrund von Vergleichen mit anderen autonomen Ganglienzellen nahmen die Autoren eine Einteilung in verschiedenen Gruppen von Neuronen vor und beschrieben zudem “pericellular baskets of varicose nerve terminals” sympathischer und sensorischer Herkunft.

Diese Arbeiten lassen auf eine entscheidende nitrege Innervation mit dem Vorkommen von NOS-positiven Interneuronen als Schaltstellen des kardialen Plexus schließen. Hingegen mag die Bedeutung einer nitregeren Innervation durch das wesentlich höhere Vorkommen der Hämoxxygenase 2 (HO-2; diese bildet CO, das wie NO als NANC-Transmitter gilt) in kardialen Ganglien des Meerschweinchens (Hassall et al. 1997) an Gewichtung verlieren. Ein weiterer kritischer Aspekt ist, dass die endotheliale Isoform der NO-Synthase im Herzen einiger Säuger (Meerschweinchen, Ratte, Schwein) den Hauptanteil der NOS-Markierungen ausmacht (Ursell et al. 1993, 1995). Diese Befunde relativieren den möglichen nitregeren Einfluss an der kardialen Innervation durch nNOS. In Knock out-Mäusen, denen das Gen der nNOS fehlt, wurde die Reaktion auf eine myokardiale Ischämie untersucht, es zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp kein signifikanter Unterschied bezüglich der Infarktgröße.

#### 4.2.3 Respiratorisches System

In allen Abschnitten des Respirationstrakts konnten spezifische NOS-Markierungen gefunden werden. Die positiven Neurone in *Trachemys scripta elegans* befinden sich in direkter Umgebung von Larynx und Trachea, im N. laryngeus recurrens und in intrapulmonalen

Ganglien. In der Schildkröte fanden sich stets kleinere Ganglienzellanhäufungen hilär und weniger peripher (perivascular, im subepithelialen Bindegewebe, mit glatter Muskulatur assoziiert). Diese Lokalisationen für NOS konnten auch immunzytochemisch und histochemisch für die Säuger-Spezies Meerschweinchen (Fischer et al. 1993), Schwein und Mensch (de Rada et al. 1993) ausgemacht werden. Hassall (1993a) beschrieb lediglich NADPHd-positive paratracheale Neurone des Meerschweinchens. Auch in der Maus ist NOS im Respirationstrakt nachgewiesen. Hier sind ebenfalls Zellkörper im Bereich des Hilus prominent. Neben peribronchalen Lokalisationen werden häufiger positive Signale um pulmonale Blutgefäße als in der direkten Umgebung der Luftwege gefunden (Guembe et al. 1999). Da auch neurale Plexus der Amphien-Lunge (Bodegas et al. 1995) eine positive Färbereaktion in der NADPHd zeigten, ist von einer evolutionär weit verbreiteten nitrergen Innervation des Respirationstrakts auszugehen.

In Kolokalisation zu VIP konnten nitrerge neuronale Geflechte der Trachea des Frettchens identifiziert werden (Dey et al. 1993). Zudem konnte die Verteilung von Cholinazetyltransferase (ChAT), VIP, NOS und SP im longitudinalen muskulären Strang des trachealen Plexus wie in Ganglien des oberflächlich gelegenen muskulären Plexus im Frettchen dargestellt werden (Dey et al. 1996). Während die vornehmlich im longitudinalen muskulären Strang gelegenen cholinergen Ganglien kein VIP, NOS oder SP exprimierten, sind diese Mediatoren häufig im oberflächlichen Plexus kolokalisiert (11% NOS allein, 20% VIP allein, 5% SP allein, 67% NOS + VIP, 40% VIP + SP). Um die Verbindungen der longitudinalen Strang-Ganglien mit den Ganglienzellen des oberflächigen muskulären Plexus zu untersuchen, wurden neuronale Tracer (Rhodamin und Biotin-markierte Dextranamine) verwandt. Eine reziproke Kommunikation von beiden Ganglienzellgruppen im Frettchen sowie der Hinweis auf Empfang wie auch Sendung von Signalen zwischen VIP- und NOS-enhaltenden Neuronen wurde offenbar (Zhu et al. 2001).

Im Meerschweinchen fand sich NADPHd-Reaktivität im Respirationstrakt in glatter Muskulatur, submukösen Drüsen, um bronchiale und pulmonale Arterien und lediglich vereinzelt in den Ganglienzellen der Luftwege. Häufige Kolokalisationen zu VIP, nicht

jedoch zu CGRP, wurden von Shimosegawa et al. (1994) beschrieben, während in immunhistochemischen Experimenten zur Durchblutung des Larynx der Ratte reichlich CGRP- wie NOS, NP Y und VIP-Signale in den Gefäßnervenfasern beobachtet wurden (Lyon, 2000). Die Markierungen reichen von der A. thyroidea superior bis zu kleinen Arteriolen im terminalen Gefäßbett. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Neurotransmitter und des Umstands, dass einige sowohl vasodilatatorisch wie vasokonstriktorisch wirken, ist möglicherweise die Verteilung und das komplexe Zusammenspiel der Mediatoren entscheidend dafür, welche Neuromodulation das Effektororgan erfährt.

#### 4.2.4. Verdauungstrakt und viszerale Organe

Bis heute bestehen erhebliche Defizite im Verständnis der neuronalen Transmitter und ihrer Interaktionen im enterischen Nervensystem. In Kenntnis davon, dass weder adrenerge noch noradrenerge Substanzen (NANC) eine Relaxation der Darmmuskulatur bewirken, schlossen Burnstock et al. (1983) auf die Existenz einer NANC-Transmission.

Das Vorkommen von NADPHd im enterischen Nervensystem wurde 1989 von Branchek und Gershon beschrieben; Bredt et al. (1990a) führten den immunzytochemischen Nachweis der NO-Synthase im Plexus myentericus. Auch physiologische Experimente gaben Hinweise auf NO als NANC-Transmitter. Die durch elektrische Reizung des Auerbach-Plexus erzielte Entspannung der glatten Muskulatur des Darms ließ sich durch Gabe von Hemmstoffen der NOS blockieren, zudem konnte gezeigt werden, dass direkt dem Darm zugeführtes NO-Gas wie in der elektrischen Stimulation zur Relaxation führt (z. B. De Man et al. 1991; Stark et al. 1991; Thornbury et al. 1991, Ward et al. 1992).

Während in *Trachemys scripta elegans* innerhalb der ganzen Zunge vereinzelt nitregerge Neurone in kleinen Gruppen von neuronalen Perikaria um Muskelfaserzüge und perivascular in der Submucosa liegen, konnten im Gegensatz zur Maus (Grozdanovic et al. 1992) keine

positiven Markierungen in unmittelbarer Nähe von Papillen gefunden werden. Positive Nervenfasern und Zellkörper waren oft in enger Verbindung zum R. intermandibularis medius (N.V3) lokalisiert. Bei *Eretmochelys imbricata* enthält der Nerv nur viscerosensible Fasern, die Chorda tympani fehlt (Soliman, 1964). Laut Poglayen (1955, zitiert nach Soliman, 1964) konnte Fuchs bei *Emys* die Chorda tympani identifizieren, somit wären auch im untersuchten Tier Geschmacksfasern für den vorderen Teil der Zunge anzunehmen. Der Nachweis einer gustatorischen nitrergen Innervation konnte jedoch nicht erbracht werden.

Die Lokalisation und mögliche Funktion nitrerger Innervation im Pharynx ist bisher wenig untersucht. In der Schildkröte konnten subepitheliale spezifische neuronale Markierungen gefunden werden, in der Maus auch in Fasern der quergestreiften Muskulatur. In physiologischen Experimenten an der Katze (Beyak et al. 2000) konnte nach intrazerebroventrikulärer Applikation eines NOS-Inhibitors eine Reduktion des oropharyngealen Schluckens in peristaltischer Frequenz und Amplitude vor allem der glatten Muskulatur gemessen werden. Somit wird der neuronalen Stickoxidsynthese eine wichtige Funktion im Schluckakt wie in der oesophagealen Peristaltik zugeschrieben. Knight und Burnstock (1999) konnten an Präparaten des Ösophagus der Eidechse (*Agama*) zeigen, dass die inhibitorische NANC-Wirkung auf die Ringmuskulatur vor allem durch Stickoxid vermittelt wird.

Die Schildkröte zeigt nitrerge Markierungen im Meissner-Plexus vom Oesophagus bis zum Pylorus in abfallender Dichte. Im Duodenum besteht wieder ein hoher Anteil positiver Signale, der sich bis zur Kloake erneut verringert. Im Sphinkter des Pylorus ist die Anzahl der Neurone am höchsten, hier dominieren die Markierungen im Auerbach-Plexus; während im Oesophagus auch eine hohe Neuronendichte imponiert, lässt diese aber ein eher ausgewogenes Verhältnis der spezifischen Signale in beiden Plexus erkennen. Im Oesophagus der Ratte konnte gezeigt werden, dass myenterische NADPHd-markierte Neurone Fasern zur motorischen Endplatte besitzen und offenbar an der Innervation der quergestreiften Muskulatur beteiligt sind (Neuhuber et al. 1994).

Bezüglich der Gesamtheit aller spezifischen nNOS-Markierungen im Plexus

myentericus und submucosus des Intestinums von *Trachemys scripta elegans* ist festzustellen, dass positive Zellen und Fasern in etwa gleicher Weise in den beiden Plexus vorkommen. In *Trachemys* findet sich somit im Gegensatz zu Säugern keine nitrerge Prädominanz im Plexus myentericus. Die Aussage Lamannas et al. (1999), anhand von Befunden in der Eidechse und Schlange, dass die Verteilung beider Populationen der einiger Säuger und anderer Vertebraten ähnelt, ist als eine eher vage Beschreibung zu bezeichnen. Hingegen dokumentieren Hiramatsu et al. (1999) in Experimenten am Darm des Huhns “no significant differences in the number of enzyme-positiv nerve cell bodies per ganglion of the myenteric and the submucosus plexuses among three different caecal regions; proximal, middle and distal regions”. In weiteren Untersuchungen an Reptilien bestätigten Martinez-Ciriano et al. (2000) die Befunde von Lamanna et al. (1999) in der Eidechse. Olsson und Gibbins (1999) untersuchten den Gastrointestinaltrakt von Krokodilen (*Crocodylus porosus*). Sie fanden in allen Regionen NOS-positive Neurone, wobei eine Minorität mit VIP kolokalisierte.

Im Meerschweinchen beschreiben Furness et al. (1994) NOS-enthaltende Nervenzellkörper im Plexus myentericus innerhalb des gesamten Gastrointestinaltrakts und im Plexus submucosus lediglich im Magen, Kolon und Rektum.

In Untersuchungen am Darm der Ratte, nur NADPHd-Histochemie nutzend, zeigten Nichols et al. (1992) zwar ebenfalls eine Dominanz der positiv markierten Ganglienzellen des Plexus myentericus und auch einen höheren Anteil vermutlich nitrerger Strukturen im Dünndarm als im Dickdarm, aber fanden innerhalb des ganzen Gastrointestinaltrakts Markierungen im Plexus submucosus. Dies scheint, wie an den Untersuchungen an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Opossum, Schwein, Affe, Mensch gezeigt wurde, die grundlegende Lokalisaton im Säuger zu sein.

Besonders bemerkenswert sind aber die Ergebnisse von Li und Furness (1993b) an Neuronen des vagalen Strangs des Plexus myentericus der Regenbogenforelle; es stellten sich nur 60% der NADPHd-positiven Zellen auch in der NOS-Immunzytochemie positiv dar. In Untersuchungen am Goldfisch (Brüning et al. 1996a,b) stellte sich die nitrerge Innervation des Gastrointestinaltrakts ebenfalls hauptsächlich in der Muscularis dar.

Die Muscularis mucosae von Oesophagus, Magen, Kolon und Rektum im Meerschweinchen ließ eine mäßige bis dichte Innervation durch terminale NOS-Fasern erkennen. In der Schildkröte *Trachemys scripta elegans* konnten zudem nitrege Fasern im Dünndarm gefunden werden.

Die Existenz nitreger Nervenzellen und Nervenzellfortsätze in der Schildkröte bestätigt die in vielen histologischen wie physiologischen und pharmakologischen Arbeiten etablierte Vorstellung von NO als inhibitorischer d.h. relaxierender NANC-Transmitter im enterischen Nervensystem. Möglicherweise zeichnet sich beim Reptil und möglicherweise auch bei Vögeln eine von Säugern verschiedene, entwicklungsgeschichtlich ältere Lokalisation nitreger Neuronenpopulationen mit einer signifikant höheren, dem Plexus myentericus entsprechenden Verteilung im Plexus submucosus ab. Die in der Submukosa liegenden Neurone modulieren offenbar den Gefäßtonus zur Regulierung des Blutflusses (Furness et al. 1994).

Schon früh wurden Kolokalisationen zu anderen Neurotransmittern beschrieben, oft basierten diese jedoch in Ermangelung spezifischer Antisera auf der NADPH-Diaphorase-Aktivität allein.

Die Koexistenz von VIP und NOS, nicht aber von SP im Meerschweinchen ist beschrieben (Costa et al. 1992). Aimi et al. (1993) bestätigen dies für die Ratte und bemerken eine nahezu vollständig präsenzte VIP und NOS-Kolokalisation, Balaskas (1995) zeigte beide Mediatoren kolokalisiert im Darm des Huhns, in Reptilien soll Galanin (GAL) häufiger als VIP koexprimiert sein (Lamanna et al. 1999). Auch Kirchgessner et al. (1994) beschrieben eine vollständige Kolokalisation mit NADPHd zu GAL und eine eher geringe zu VIP und NP Y des Plexus myentericus der Ratte.

Im Zäkum des Meerschweinchens ist das Vorkommen von Dynorphin (DYN), Enkephalin, Gamma-Amino-n-Buttersäure (GABA), SP, VIP und nur vereinzelte von GAL, NP Y und Gastrin releasing Peptid beschrieben (Furness et al. 1992). Alle VIP-positiven, aber keine SP-positiven Nervenfasern waren NOS-reaktiv. Die Autoren interpretierten, dass es zwei Hauptgruppen enterischer Neurone gäbe, exzitatorische: Ach, SP, andere Tachykinine

und zumeist DYN und ENK, sowie inhibitorische Neurone, die NO, VIP, zumeist die beiden Opiode und möglicherweise ATP als Transmitter-Substanzen beinhalten.

Das menschliche Ileum wurde von Dhatt et al. (1994) in Subgruppen aufgeteilt. Submuköse Nervenzellen enthalten demnach entweder SP/Somatostatin/CGRP oder VIP/NPY/Calbindin-D28k. Auch im Auerbach-Plexus wurden zwei Gruppen bestimmt, die entweder Calbindin oder NADPHd positiv waren. Die NADPHd-Gruppe kolokalisierte zum Teil mit VIP und Met-Enkephalin-Markierungen.

Wichtige Erkenntnisse zur Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) als Neurotransmitter wurden in Maus-Mutanten erbracht, denen das Gen zur Kodierung der nNOS bzw. der Hämoxxygenase 2 (HO-2) deletiert wurde. Huang et al. (1993) entfernten auf beiden Allelen das Gen für die nNOS und fanden als einziges morphologisches Korrelat eine hypertrophierte Ringmuskulatur, besonders ausgeprägt im Pylorus. Vanderwinden et al. (1992) zeigten zudem keine NADPHd in myenterischen Neuronen bei Neugeborenen mit Pylorusstenose. Letztlich durch diese Befunde sollte das flüchtige (in hohen Konzentrationen toxisch wirkende) Gas als Neurotransmitter im enterischen Nervensystem angesehen werden.

Zakhary et al. (1997) beschrieben neben der Kolokalisation von nNOS und HO-2 auch eine deutliche verringerte NANC-Relaxation nach elektrischer Stimulation in Maus-Mutanten, denen das Gen für HO-2 fehlt. Xue et al. (2000) konnten an den sogenannten Knockout-Mäusen zwei weitere bemerkenswerte Feststellungen machen: in Doppel-Knockout-Mäusen zeigte sich ein additiver Effekt bezüglich verringerter Stimulierbarkeit, in HO-2-Knockout-Mäusen konnte durch exogen hinzugeführtes CO eine normale Reizreaktion ausgelöst werden. Die Autoren wiesen folglich darauf hin, dass NO ohne CO nicht funktionstüchtig sei und beschrieben ihrer experimentellen Interaktion wegen die beiden Stoffe als Kotransmitter.

In der Gallenblase von *Trachemys scripta elegans* war nur eine geringe nitrege Innervation zu erkennen. Positive Befunde sind auch bei Säugern, z.B. Maus (Grozdanovic et al. 1992), Meerschweinchen (Grozdanovic et al. 1994), Affe und Mensch (De Giorgio et al.

1994) bekannt. Wie von Shaffer (2000) zusammenfassend dargestellt, wirkt Cholezystokinin auf den Sphinkter Oddi via präganglionäre cholinerge Nerven, die VIP und NO freisetzen, um den muskulären Tonus zu verringern.

Während für viele Säuger NADPHd und NOS-positive Markierungen im exokrinen wie im endokrinen Pankreas beschrieben worden sind (Shimosegawa et al. 1992; De Giorgio et al. 1994; Kirchgesser et al. 1994; Wörl et al. 1994; Ekblad et al. 1994), konnte keine nitrerge Innervation in diesem Organ in der Schildkröte gefunden werden. Da jedoch in der entwicklungsgeschichtlich weiter entfernten und älteren Gattung der Fische keine pankreatischen Nerven erkennbar waren und die Blutgefäße der Inselzellen nicht auf Nitroprussid-Natrium als NO-Donator reagierten (Jansson et al. 1998), während in der näher stehenden Gattung der Vögel NADPHd-Aktivität ausgemacht werden konnten (Liu et al. 1994; Mensah-Brown et al. 2000), ist der bei der Schildkröte vorliegende negative Befund möglicherweise Folge einer unzulänglichen Präparation mit zu geringer Formalin-Fixierung und autolytischen Prozessen des Verdauungsenzym-synthetisierenden Organs oder das Pankreas ist tatsächlich nicht nitrerg innerviert. Weitere Untersuchungen mit geänderter Präparation und/oder mittels molekularbiologischer Nachweismethoden zum Vorkommen der NOS im Pankreas von Reptilien erscheinen notwendig.

In den Experimenten zur NOS-Lokalisation von *Trachemys scripta elegans* wurde die Leber lediglich hinsichtlich des Organparenchyms untersucht, dieses zeigte keine positiven Markierungen. In Ratte und Katze konnte ein dichter nitrerger Plexus um die interlobuläre A. hepatica, die Arterien der Portalfelder und um interlobuläre Gallengänge des Leberhilus gefunden werden (Esteban et al. 1997, 1998). Eine nitrerge Innervation der Leber scheint derzeit keine Bedeutung zu haben, könnte aber die Blutversorgung betreffen und diese modulieren.

Zum Vorkommen von nNOS in der Milz wurden bisher keine detaillierten Ergebnisse veröffentlicht. Offenbar wird in der vorliegenden Arbeit erstmals überhaupt das Vorkommen von Nervenzellen in der Milz beschrieben. Da sich die zahlreichen neuronalen Markierungen in den lymphoreticulären Arterienscheiden des Parenchyms von der A. splenica im Milzhilus

bis zu deren Verzweigungen in Pinselarteriolen darstellen lassen, ist von einer wesentlichen Funktion des neuronalen NO auch im lymphatischen Gewebe auszugehen. Bemerkenswert ist, dass erhebliche geschlechtsunspezifische intraindividuelle Schwankungen in der neuronalen Dichte aufzuweisen waren. Das Vorkommen der induzierbaren Isoform des Enzyms in Neuronen und deren Fortsätzen, als unspezifische Markierung scheint eine eher unwahrscheinliche Erklärung zu sein. Möglicherweise handelt es sich um eine natürliche Varianz oder um immunologisch regulierte Prozesse.

Die positiven Funde in der Milz lassen die Fragen nach weiteren Lokalisationen im lymphatischen System und auch bei anderen Gattungen aufkommen. Bei einem etwaigen Vorkommen beim Menschen stellt sich die Frage, ob und in welchem Maß die Gabe von NO-Donatoren, wie in der Therapie der koronaren Herzkrankheit, einen immunmodulatorischen Effekt besitzt.

In einer Untersuchung zum Verhältnis von iNOS und nNOS (Bandyopadhyay et al. 1997) konnte gezeigt werden, dass nach Interferon-Gaben iNOS induziert und nNOS vermindert gebildet wurde. Die i/nNOS-Messungen erfolgten als Detektion der mRNA mittels PCR. Als weiteres Ergebnis konnte eine VIP-vermittelte Reduktion des iNOS-Anteils festgestellt werden. Somit bestätigen diese Untersuchungen auch molekularbiologisch das nNOS-Vorkommen in der Milz der Ratte und lassen deutlich durch immunmodulatorische Substanzen und andere Neurotransmitter hervorgerufene Änderungen der NOS-Expression erkennen.

#### 4.2.5 Urogenitalsystem

In vielen Abschnitten des Urogenitalsystems der Schildkröte konnten nitrege Neurone gefunden werden. Die Anzahl NOS-positiver Fasern ist gering entlang der Ductuli efferentes und des Ductus epididymidis, des Oviducts, perivascular der Schwellkörper von Klitoris und Penis sowie der Ureteren. Dagegen stellte sich in der Harnblase und in den akzessorischen Harnblasen ein dichter spezifischer markierter Plexus besonders in der

Muskelschicht dar, dessen höchste Dichte um die Sphinkteren liegt. Das Ovar sowie die Fimbrien des Oviducts erwiesen sich als negativ.

Dieses Verteilungsmuster entspricht im wesentlichen dem der Säuger (McNeill et al. 1992; Persson et al. 1993; Burnett et al. 1993; Grozdanovic et al. 1994; Smet et al. 1994). In vielen pharmakologischen Arbeiten, die Stickoxid als NANC-Transmitter im Urogenitalsystem ausmachten, wurde der relaxierende Effekt der Substanz demonstriert (Andersson et al. 1991; Dokita et al. 1991; Zygmunt et al. 1993). Burnett et al. (1992) zeigten, dass durch NOS-Inhibition die Erektion des Penis von Ratten unterbunden werden konnte. Auch Levin et al. (1994) demonstrierten mittels Inhibition durch L-Nitroarginin eine kavernöse Relaxation, die um 95% reduziert war und bestätigten somit die wichtige Rolle der nitrergen Innervation der Schwellkörper. Da ein großer Anteil der Neurone der im Becken gelegenen Ganglienzellen spezifische NOS-Markierungen aufweist und ein großer Teil der Organe des Urogenitalsystems lediglich eine geringe NOS-Innervation aufweist, ist von einer vornehmlich extramuralen nitrergen, d.h. ganglionären Innervation im Urogenitalsystem auszugehen.

Aufgrund der Ergebnisse von Keast (1991) und Ceccatelli et al. (1994), die eine vornehmliche Tyrosin Hydroxylase/NPY-Kolokalisation bzw. eine NOS/VIP-Kolokalisation feststellten, folgerten auch Alm et al. (1995), dass erstere sympathische und letztere parasympathische Neurotransmitter in diesem Organsystem darstellen.

Da sich in anderen Teilen des PNS der Säuger und auch anderer Vertebraten NOS und VIP als beständiges Paar relaxierender Neurotransmitter erwiesen haben, liegt es nah, auch für das Urogenitalsystem diese Kolokalisation anzunehmen. Beim Menschen fanden Tamura et al. (1995) in den Nervenendigungen, die die glatte Muskulatur und die Arterien der Schwellkörper versorgen, eine Kolokalisation von NOS zu VIP von ca. 40%, zu TH von ca. 25%. Mittels retrograder-axonaler Markierung zeigte der Autor (1997), dass 60-70% der zum Corpus cavernosum projizierenden Nervenfasern VIP enthalten; er fand eine 70-80% Kolokalisation von NOS und VIP im Ganglion pelvium major der Ratte. Im Gegensatz dazu zeigte Vanhatalo et al. (2000) keine NOS-VIP-Kolokalisation in der Innervation der glatten

Muskelfasern des Penis beim Rind und folgte eine Spezies-abhängige Verteilung der Neurotransmitter.

Zur Klärung der Frage, ob auch eNOS an der Innervation des Corpus cavernosum beteiligt ist, deepithelisierten Kim et al. (1994) Schwellkörper des Kaninchens und fanden nach elektrophysiologischer Stimulation eine lediglich abgeschwächte Reaktion.

Untersuchungen zur Rolle von CO als Neurotransmitter ergaben in HO-2-knock-out Mäusen lediglich eine herabgesetzte Reflexaktivität der bulbospongiösen Muskulatur (Burnett et al. 1998). Hedlund (2000) konnte an Noradrenalin-kontrahierten Strängen glatter Muskulatur des Corpus cavernosum und spongiosum vom Menschen eine Relaxation durch exogenes NO, nicht aber durch CO-Gaben erreichen.

In den intramuralen Ganglienzellen der glatten Muskulatur von Harnblasen-Basis, Detrusormuskel und in der proximalen Urethra hingegen fanden Werkstrom et al. (1998) alle Nervenzellkörper HO-positiv markiert. Die NOS-Kolokalisation betrug ca. 70%, VIP wurde nur in geringer Anzahl gefunden, in der Urethra waren nur noch eine geringe Anzahl von Markierungen lokalisiert. Trotz der Prädominanz der HO-Markierung erbrachten NO bzw. der NO-Donator Linsidomin (SIN-1) und VIP deutliche Relaxationen der Präparation. In der Urethra des Menschen konnte ebenfalls eine etwa 70%ige Kolokalisation von NOS und HO-2 dokumentiert werden (Ho et al. 1999).

Aufgrund dieser Daten ist von einer Prädominanz von NO sowie einer lediglich unterstützenden Aufgabe von VIP und CO in den Funktionen Erektion, Ejakulation sowie Harnblasenkontrolle des Urogenitalsystems auszugehen.

Zur neuronalen NOS-Innervation der Ovarien liegen nur wenige Arbeiten vor. Van Voorhis et al. (1995) detektierten in Ovarien der Ratte eNOS-mRNA, nicht aber nNOS-mRNA. Drazen et al. (1999) beschrieben an nNOS-knock-out Mäusen eine reduzierte Anzahl von Oozyten unter Behandlung mit L-Nitroarginin, die sich jedoch durch Gonadotropin-Gaben normalisierten. Im Hamster konnte hingegen durch langanhaltende Stimulation des muscarinischen M1-Rezeptors nNOS in Ovarienzellen gefunden werden (Cuadra et al. 1997). Eine natürlich vorkommende nervale NOS-gesteuerte Regulation scheint im Ovar nicht

vorhanden zu sein. Lamanna et al. (2001) fanden NOS-positive Zellen und Fasern im Eileiter der Eidechse. Auch in den eigenen Untersuchungen an der Schildkröte konnten positive Nervenfasern im Oviduct gefunden werden.

#### 4.2.6 Nebenniere

Das Vorkommen NOS-positiver Neurone in der Nebenniere ist in mehreren Arbeiten an Säugern dokumentiert worden (Bredt et al. 1990a,b; Dawson et al. 1991; Afework et al. 1992; Dun et al. 1993a; Cecatelli et al. 1994, Heym et al. 1994; Brüning, 1994a). Die NO-erge Innervation betrifft sowohl die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, als auch die hormonproduzierende Nebennierenrinde und die parenchymalen Blutgefäße. Dun et al. (1993b) und Heym et al. fanden in Untersuchungen an Ratte und Mensch das chromaffine Gewebe spezifisch markiert, im Widerspruch zu den Ergebnissen von Afework et al. (1992) und Brüning (1994a), die weder NOS-IR noch NADPHd in den chromaffinen Zellen von Ratte und Maus fanden. Schwarz et al. (1998) detektierten an in Kultur gehaltenen chromaffinen Zellen des Rindes zu 90% nNOS mittels Immunzytochemie und überprüften ihre Ergebnisse anhand des positiven Nachweises von nNOS mRNA mittels reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion.

In der vorliegenden Arbeit werden positive Befunde bestätigt, der anatomische Aufbau des Nebennierengewebes lässt jedoch einen direkten Vergleich mit Säugern nicht zu: Die Nebenniere von *Trachemys scripta elegans* ist nicht in Rinde und Mark unterteilt, sondern enthält das chromaffine Gewebe als kleine Inseln, die im Steroidhormonproduzierenden Gewebe verstreut sind. Besonders auffällig sind zudem die vielen Anhäufungen einzelner und kleiner Gruppen fusiformer spezifisch markierter Ganglienzellen und ihrer Fortsätze. Nach Kolossow (1930) und Hebard und Charipper (1955) enthält die Nebenniere der Schildkröte eine Vielzahl sympathischer Ganglien. Vermutlich handelt es sich also bei diesen Neuronen um NOS-haltige sympathische Ganglienzellen. Um die Herkunft zu dem hier untersuchten sympathischen Halsganglion, welches in beiden Markierungen negativ

erschien, bzw. die Funktion dieser Ganglien zu bestätigen, wären Kollokalisations-Untersuchungen mit Tyrosin-Hydroxylase als Markerenzym notwendig. Handelte es sich tatsächlich um sympathische Ganglienzellen, so wäre dies ein Unterschied zu dem untersuchten kranialen sympathischen Ganglion cervicale, das in den Markierungen negativ erschien. Eine unterschiedliche nitrerge Innervation von zervikalem und Anteilen des kaudalen (“sakralen”) Sympathikus ist natürlich möglich.

In Studien an der Ratte zeigte Afework (1995) in intra-adrenalen Nervenzellkörpern und Fasern NADPHd und VIP vollständig kollokalisiert. Nur einige NPY-haltige Nervenzellen enthielten auch NADPHd. CGRP, SP und TH enthaltende Neurone waren NADPHd-negativ. Die Kollokalisationsexperimente von Schwarz et al. (1998) der erwähnten bovinen Nebennierenzellen zeigten im Gegensatz dazu immunzytochemisch eine hauptsächliche Koexpression von nNOS, Tyrosin-Hydroxylase und Phenylethanolamin-N-Methyltransferase. Eine nNOS-Markierung des chromaffinen Gewebes der Schildkröte konnte weder immunzytochemisch noch in NADPHd gefunden werden.

Neben einem speziesdefinierten Neurotransmitter-Muster kann auch immer das Benutzen unterschiedlicher Präparationen und Antisera für differierende Ergebnisse mitverantwortlich sein. Um die Funktion des neuronalen NO in der Nebenniere zu bestimmen, maßen Marley et al. (1995) an isolierten perfundierten Rindernebennieren den Effekt von NO-Donatoren und Hemmstoffen bezüglich der Adrenalin/Noradrenalin-Sekretion in elektrischer Feldstimulation und konnten dabei keinen signifikanten Unterschied erkennen. Schwartz (1998) beschrieb hingegen ebenfalls an isolierten bovinen Nebennieren eine basale nNOS-Aktivität, die bei L-Nitroarginin-Hemmung zu einer verstärkten Katecholamin-Freisetzung nach Azetylcholin-Stimulation führte.

Somit ist, wenn auch nicht von einer direkten Katcheloamin-Freisetzung durch NO, so doch von einer Modulation auszugehen. Neben der direkten Beeinflussung könnte ein weiterer Aspekt der “NO-Transmission” der Langzeiteffekt sein. Blottner (1997) diskutiert derartige Mechanismen, als “long-term” Aktivität, die durch veränderte Genexpression den Fibroblasten-Wachstumsfaktor beeinflussen.