

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut an der  
Dr. Senckenbergischen Anatomie  
Institut für Anatomie II  
Experimentelle Neurobiologie  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Die Chemoarchitektur des Plexus tympanicus:  
Immuncytochemische Studien zum Nachweis von Transmittern und  
Peptiden bei Wistar-Ratten**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Meike Pfeiffer

aus Karlsruhe

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referent: Prof. Dr. Frank Nürnberger  
Korreferent: Prof. Dr. Uwe Baumann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Die Lokalisation des Plexus tympanicus im Hörsystem.....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Das Ohr der Ratte mit umgebenden Strukturen.....	12
1.1.1.1 Äußeres Ohr.....	12
1.1.1.2 Mittelohr .....	16
1.1.1.3 Innenohr.....	22
1.1.1.4 Nerven- und Gefäßverläufe.....	24
1.1.2 Der Plexus tympanicus .....	27
1.1.3 Der Plexus tympanicus als Komponente des vegetativen Nervensystems.....	31
1.1.3.1 Adrenerge Systemkomponenten.....	37
1.1.3.2 Cholinerge Systemkomponenten .....	40
<b>1.2 Potentiell im Plexus tympanicus vorkommende Neuropeptid- und         Neurotransmittersysteme.....</b>	<b>44</b>
1.2.1 Vasoaktives intestinales Peptid .....	48
1.2.2 Neuropeptid Y.....	50
1.2.3 Substanz P .....	52
1.2.4 Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase .....	56
1.2.5 Cholin-Acetyl-Transferase .....	57
<b>1.3 Fragestellung.....</b>	<b>59</b>

<b>2</b>	<b>Material und Methodik .....</b>	<b>61</b>
2.1	Versuchstiere .....	61
2.2	Materialgewinnung.....	61
2.3	Immuncytochemische Aufarbeitung der Kryostatschnitte.....	62
2.3.1	Grundlagen der Immuncytochemie.....	63
2.3.2	Benötigte Reagenzien .....	68
2.3.3	Immuncytochemisches Färbeprotokoll .....	71
2.4	Auswertung und Analyseverfahren .....	73
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
3.1	Immuncytochemische Befunde an Peptid- und Transmittersystemen im Plexus tympanicus .....	74
3.1.1	Vasoaktives intestinales Peptid .....	74
3.1.2	Neuropeptid Y.....	86
3.1.3	Substanz P .....	98
3.1.4	Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase .....	109
3.1.5	Cholin-Acetyl-Transferase .....	120
3.2	Übersichtsskizzen.....	129
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>146</b>
4.1	Methodenkritik und Optimierungsmöglichkeiten der Techniken	146
4.2	Würdigung der spezifischen Peptide und Transmitter .....	152
4.3	Zusammenspiel der untersuchten Systeme .....	159
4.4	Ausblick .....	163

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>167</b>
5.1	Zusammenfassung in deutscher Sprache .....	167
5.2	Zusammenfassung in englischer Sprache .....	169
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>188</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>190</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>191</b>
<b>10</b>	<b>Schriftliche Erklärung .....</b>	<b>192</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Meatus acusticus externus und Membrana tympanica. Eigener Befund.....	14
Abbildung 2:	Cavitas tympani (ventrale Wand entfernt, linkes Ohr). Nach Schünke et al. 2009 .....	16
Abbildung 3:	Rechtes Mittelohr einer Ratte (Schräg-Ansicht von rostro-latero-dorsal). Modifiziert nach Hebel und Stromberg 1995 ...	19
Abbildung 4:	Gehörknöchelchen im Mittelohr. Eigener Befund .....	21
Abbildung 5:	Innenohr. Eigener Befund .....	22
Abbildung 6:	Verlauf des N. facialis. Nach Schünke et al. 2018.....	24
Abbildung 7:	Der Nervus Jacobsonii in der Paukenhöhle. Nach Heitzmann 1885 .....	28
Abbildung 8:	Der Plexus tympanicus. Nach Schünke et al. 2018.....	29
Abbildung 9:	Efferente Strecke somatischer und vegetativer Nerven. Modifiziert nach Schiebler et al. 2007 .....	33
Abbildung 10:	Katecholaminsynthese. Nach Purves und Williams 2004 .....	38
Abbildung 11:	Übersicht über Synthese, Freisetzung und Recycling von Acetylcholin. Modifiziert nach Kummer 2008.....	42
Abbildung 12:	Überblick über die Biosynthese von Neuropeptiden bis zu ihrer Sekretion. Modifiziert nach Mains 1999 .....	46
Abbildung 13:	Aminosäuresequenz von VIP, isoliert aus dem Gastrointestinaltrakt des Rindes .....	48
Abbildung 14:	Aminosäuresequenz von NPY, isoliert aus dem Rattenhirn ...	50
Abbildung 15:	Aminosäuresequenz von SP, isoliert aus bovinem Hypothalamusgewebe.....	53
Abbildung 16:	ABC-Methode. Modifiziert nach Oliver und Jamur 2010 .....	65
Abbildung 17:	Vereinfachter Mechanismus der Peroxidasereaktion mit DAB und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Modifiziert nach Polak und van Noorden 2003 .....	66
Abbildung 18:	VIP-ir Fasern an Gefäßwänden.....	75
Abbildung 19:	VIP-Markierung im Bereich der Glandula parotidea und im umliegenden Gewebe .....	76

Abbildung 20:	VIP-ir Elemente im äußeren Gehörgang und am Trommelfellansatz .....	79
Abbildung 21:	VIP-ir Zellen und Nervenfasern in der Mittelohrschleimhaut ..	80
Abbildung 22:	VIP-ir Elemente in der Mittelohrschleimhaut mit zuführenden Nervenfasern.....	81
Abbildung 23:	VIP-Markierungen an der Gehörknöchelchenkette .....	82
Abbildung 24:	VIP-Markierung an nervalem Gewebe .....	83
Abbildung 25:	VIP-IR im Innenohr.....	84
Abbildung 26:	NPY-IR an Gefäßen .....	87
Abbildung 27:	NPY-Markierung an Drüsen, im äußeren Gehörgang und am Trommelfellansatz.....	89
Abbildung 28:	NPY-ir Elemente im umliegenden Bindegewebe und an motorischen Endplatten .....	91
Abbildung 29:	NPY-IR in nervalen Strukturen .....	92
Abbildung 30:	NPY-ir Elemente in der Mittelohrschleimhaut.....	94
Abbildung 31:	NPY-Markierungen im Innenohr.....	97
Abbildung 32:	SP-ir Elemente um Gefäßwände.....	98
Abbildung 33:	SP-ir Elemente im Drüsen- und Bindegewebe .....	100
Abbildung 34:	SP-ir Elemente am Trommelfell .....	102
Abbildung 35:	SP-ir Nervenfasern und Ganglienzellen .....	103
Abbildung 36:	Netz aus SP-ir Elementen in der Schleimhaut der Cavitas tympani.....	104
Abbildung 37:	SP-ir Elemente an der Gehörknöchelchenkette .....	106
Abbildung 38:	SP-Markierungen im Innenohr .....	106
Abbildung 39:	DBH-ir Elemente um Gefäßwände .....	110
Abbildung 40:	DBH-IR im umliegenden Gewebe .....	111
Abbildung 41:	DBH-ir Nervenfasern und Nervenzellperikaryen .....	112
Abbildung 42:	DBH-IR im Drüsengewebe des äußeren Gehörgangs und am Trommelfellansatz.....	114
Abbildung 43:	DBH-ir Zellen und Faserverläufe in der Mittelohrschleimhaut ....	116
Abbildung 44:	DBH-IR an der Gehörknöchelchenkette.....	118
Abbildung 45:	DBH-IR im Innenohr.....	118
Abbildung 46:	ChAT-IR im Drüsen- und Bindegewebe .....	121

Abbildung 47:	ChAT-ir Elemente in der Gefäßwand .....	122
Abbildung 48:	ChAT-Markierungen an der Gehörknöchelchenkette .....	123
Abbildung 49:	ChAT-ir Elemente in der Mittelohrschleimhaut .....	124
Abbildung 50:	ChAT-IR im Innenohr .....	126
Abbildung 51:	Vorkommen von ChAT und DBH – Teil 1. Eigener Befund ..	130
Abbildung 52:	Vorkommen von ChAT und DBH – Teil 2. Eigener Befund ..	131
Abbildung 53:	Vorkommen von DBH und VIP – Teil 1. Eigener Befund .....	132
Abbildung 54:	Vorkommen von DBH und VIP – Teil 2. Eigener Befund .....	133
Abbildung 55:	Vorkommen von DBH und NPY – Teil 1. Eigener Befund ....	134
Abbildung 56:	Vorkommen von DBH und NPY – Teil 2. Eigener Befund ....	135
Abbildung 57:	Vorkommen von DBH und SP – Teil 1. Eigener Befund .....	136
Abbildung 58:	Vorkommen von DBH und SP – Teil 2. Eigener Befund .....	137
Abbildung 59:	Vorkommen von ChAT und VIP – Teil 1. Eigener Befund ....	138
Abbildung 60:	Vorkommen von ChAT und VIP – Teil 2. Eigener Befund ....	139
Abbildung 61:	Vorkommen von ChAT und NPY – Teil 1. Eigener Befund ..	140
Abbildung 62:	Vorkommen von ChAT und NPY – Teil 2. Eigener Befund ..	141
Abbildung 63:	Vorkommen von ChAT und SP – Teil 1. Eigener Befund .....	142
Abbildung 64:	Vorkommen von ChAT und SP – Teil 2. Eigener Befund .....	143
Abbildung 65:	Zusammenfassende Darstellung – Teil 1. Eigener Befund ..	144
Abbildung 66:	Zusammenfassende Darstellung – Teil 2. Eigener Befund ..	145
Abbildung 67:	Einfluss der sterischen Behinderung (steric hindrance). Modifiziert nach Sternberger 1986 .....	149

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Vorinkubationslösung .....	70
Tabelle 2:	Liste verwendeter Primärantikörper .....	70
Tabelle 3:	Liste verwendeter Sekundärantikörper .....	70



## Abkürzungsverzeichnis

Für physikalische Angaben wurden ausschließlich SI-Einheiten genutzt. Abkürzungen des normalen Schriftgebrauchs (einschlägige Wörterbücher) wurden nicht erklärt. Die Abkürzungen der Aminosäuren finden sich im Anhang.

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
ANS	autonomes (vegetatives) Nervensystem
Art.	Articulatio
AS	Aminosäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BuChE	Butyrylcholinesterase
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CHT1	Natrium-Cholin-Symporter
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
DOPA	Dihydroxyphenylalanin

Ggl.	Ganglion
GIT	Gastrointestinaltrakt
Gl./Gll.	Glandula/Glandulae
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ir	immunreaktiv
IR	Immunreaktivität
LD	Licht-Dunkel-Rhythmus
LH	Luteinisierendes Hormon
M	molare Masse
M.	Musculus
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N./Nn.	Nervus/Nervi
NA	Noradrenalin
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
Ncl.	Nucleus
NK-1R	Neurokinin-1 Rezeptor
NKA	Neurokinin A (Neurokinin α, Substanz K)
NKB	Neurokinin B (Neurokinin β, Neuromedin K)
NPY	Neuropeptid Y

PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit Triton
PNMT	Phenylethanolamin-N-methyltransferase
PNS	peripheres Nervensystem
PP	Pankreatisches Polypeptid
PYY	Peptid YY
R./Rr.	Ramus/Rami
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SP	Substanz P
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V.	Vena
VACht	vesikulärer Acetylcholintransporter
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentrales Nervensystem
°	Grad
%	Prozent

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Lokalisation des Plexus tympanicus im Hörsystem

Der Plexus tympanicus ist in der Schleimhaut der Paukenhöhle (Cavitas tympani) im Mittelohr (Auris media) lokalisiert. Das Mittelohr liegt als Teil des Hörorgans zwischen dem äußeren Ohr (Auris externa) und dem inneren Ohr (Auris interna).

Folgendes Kapitel soll eine Übersicht der anatomischen Strukturen des Mittelohrs und der umgebenden Bereiche geben. Dabei wird der Aufbau beim Menschen beschrieben; ergänzt mit Unterschieden und Spezifika der Ratte, soweit diese bekannt sind. Dieses Kapitel darf keineswegs als vollständige Übersicht über die Anatomie des Ohrbereichs angesehen werden, da insbesondere auf Strukturen eingegangen wird, die für die vorliegende Arbeit und den Plexus tympanicus relevant sind. Berücksichtigung finden diejenigen Bereiche des Ohrs, die auf den Abbildungen (Abb.) der untersuchten histologischen Präparate abgebildet sind (s. Ergebnisse). Die Darstellung in diesem Kapitel wird durch histologische Bilder nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung aus der eigenen Versuchsreihe mit Ratten untermauert. Eine schematische und beschriftete Übersichtsskizze der untersuchten Anatomie ist ebenfalls beigefügt (s. Abschnitt 3.2).

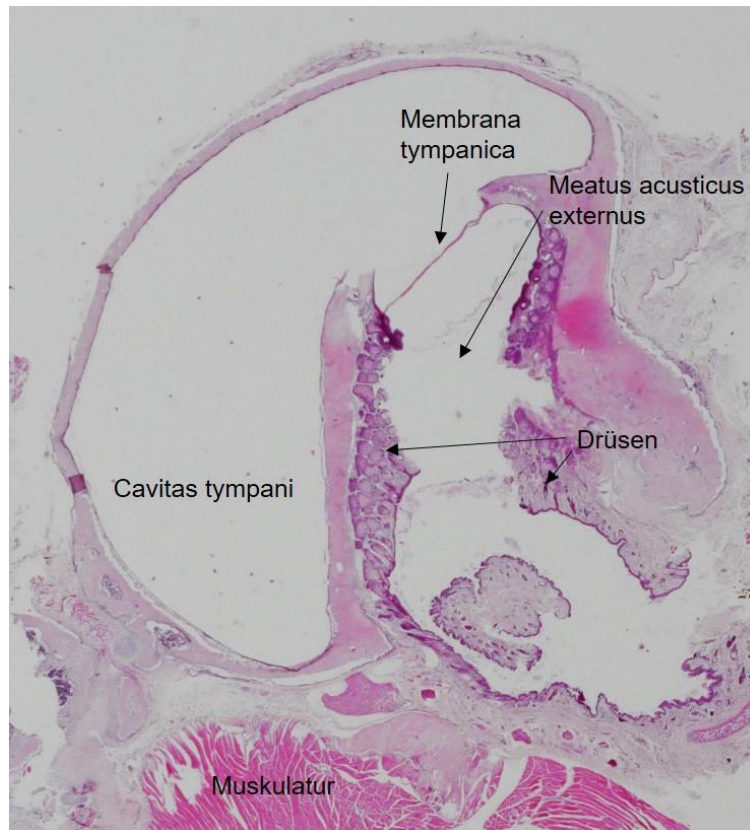
### 1.1.1 Das Ohr der Ratte mit umgebenden Strukturen

#### 1.1.1.1 Äußeres Ohr

Das äußere Ohr besteht aus der Ohrmuschel (Auricula), dem äußeren Gehörgang (Meatus acusticus externus), Muskeln und Bändern, die der Befestigung dienen, und dem Trommelfell (Membrana tympanica), welches die Grenze zwischen äußerem Ohr und Mittelohr darstellt. Funktionell werden Schallwellen aufgenommen und über das Trommelfell auf die Gehörknöchelchen im Mittelohr weitergeleitet.

Die zahlreichen intrinsischen und extrinsischen Muskeln, welche die Ohrmuschel bewegen können und auf den histologischen Präparaten angeschnitten sind (s. Abb. 1), werden von den Nervenästen Rami (Rr.) temporales und dem Nervus (N.) auricularis posterior des N. facialis innerviert.

Die Ohrmuschel der Ratte besteht, ebenso wie beim Menschen, aus elastischem Knorpel und ist von dünnen, kurzen Haaren bedeckt.<sup>1</sup> Wird der Rattenschädel von oben betrachtet, stehen die Ohren in einem 45 Grad (°)-Winkel zur Längsachse des Kopfes. Zur Lokalisation eines Geräusches kann die Ohrmuschel durch die Muskulatur vorwärts und rückwärts sowie ein- und auswärts gedreht werden, während der Kopf in die Richtung der Gehörquelle gehalten wird.<sup>2</sup>



*Abbildung 1: Meatus acusticus externus und Membrana tympanica. Eigener Befund.*

Abbildung 1 zeigt ein histologisches Präparat, auf dem der äußere Gehörgang, das Trommelfell und das Mittelohr angeschnitten sind. Der Meatus acusticus externus besteht im äußeren Teil aus elastischem Knorpel. Die Cutis des knorpeligen Anteils ist fest mit dem Perichondrium verwachsen und enthält tubulöse Drüsen (Glandulae (Gll.) ceruminiferae), Talgdrüsen (Gll. sebaceae) und Haare (Tragi). Die Gll. ceruminiferae ähneln histologisch den apokrinen Schweißdrüsen. Das Drüsensekret bildet zusammen mit abgestorbenen Epithelzellen und verschiedenen weiteren Substanzen das Cerumen, welches sowohl vor Austrocknung als auch vor eindringenden Tieren schützen soll. In der Abb. 1 sind zahlreiche Drüsen des Meatus acusticus externus abgebildet. Der innere Anteil des Gehörgangs besteht aus Knochen; hier fehlen Haare und Drüsen.<sup>3</sup>

Die Innervation des äußeren Gehörgangs übernimmt der N. auriculotemporalis für die Vorderwand des Gehörgangs und der Ramus (R.) auricularis n. vagi für die Hinterwand und den Boden des Gehörgangs. Weiterhin sind Nervenastomosen der Nervi (Nn.) facialis und glossopharyngeus bekannt.<sup>4</sup>

Bei Ratten ist der knöcherner Teil des äußeren Gehörgangs zwischen 1 mm und 2 mm lang und besitzt eine trichterförmige Erweiterung in der Nähe des Trommelfells.<sup>1</sup> Am Anulus fibrocartilagineus befindet sich eine lobuläre Talgdrüse, deren Hauptausführungsgang an der medialen Kante des Anulus mündet. Weitere kleinere Talgdrüsen befinden sich vor allem an der rostralen Wand des äußeren Gehörgangs und münden ebenfalls an der Kante des Trommelfells.<sup>5</sup> Während der äußere Gehörgang beim Menschen S-förmig ist und eher horizontal steht, ist er bei der Ratte wesentlich stärker in die Senkrechte geneigt.

Die Pars tympanica des Os temporale besitzt einen Sulcus tympanicus, in den der Anulus fibrocartilagineus eingelassen ist. Dieser Ring aus Faserknorpel befestigt und spannt das Trommelfell (Pars tensa). Nur in einem kleinen Teil, der Pars flaccida (Sharpnell-Membran), hängt das Trommelfell schlaff. In der Mitte erkennt man eine Einziehung, die durch den Hammerstiel (Manubrium mallei), der an dieser Stelle inseriert, hervorgerufen wird. Die Membrana tympanica der Ratte ist elliptisch; die lange Achse misst ca. 6 mm und die kurze Achse ca. 4 mm. Das Trommelfell hat eine Dicke von etwa 5 µm. Die dem äußeren Gehörgang zugewandte Seite ist von einfachem Plattenepithel bedeckt, welches in die Epidermis des Gehörgangs übergeht. Die Lamina propria strahlt in den Anulus fibrocartilagineus aus, welcher im Sulcus tympanicus fest mit dem Periost verwachsen ist. Die Innenseite des Trommelfells besteht ebenso aus Plattenepithel. Zur Horizontalebene ist das Trommelfell in einem Winkel von 20° geneigt.<sup>1</sup>

Die Pars flaccida besteht aus drei Schichten. Das äußere Stratum cutaneum mit einer Lamina epithelialis aus einem sehr dünnen, mehrschichtig verhorntem Plattenepithel und das innere Stratum mucosum mit einer Lamina epithelialis aus kubischem bis abgeflachtem Epithel. Beide Strata besitzen eine Lamina propria, die sich zu einer dritten Schicht vereint. Diese Mittelschicht ist reich an Fibrozyten, die ein dichtes Fasernetz aus Kollagenfibrillen bilden. Außerdem befinden sich hier feine Nervenfasern, auch lassen sich Mastzellen finden.<sup>6</sup>

An der Außenseite des Trommelfells können die gleichen nervalen Strukturen gefunden werden, die auch den äußeren Gehörgang innervieren.<sup>4</sup>

### 1.1.1.2 Mittelohr

Zum Mittelohr gehören die Paukenhöhle, die dazugehörigen pneumatisierten Räume (Cellulae mastoideae), die drei Gehörknöchelchen (Ossicula auditoria) mit ihren Muskeln und die Ohrtrumpete (Tuba auditiva, auch Tuba Eustachii). Abbildung 2 bietet eine Übersicht der Cavitas tympani mit Ansicht von ventral auf das Promontorium mit dem Plexus tympanicus.<sup>7</sup>

Die pneumatisierte Paukenhöhle lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: Epi-, Meso- und Hypotympanon.<sup>8</sup>

Bei der Ratte ist der Paukenkeller (Hypotympanon) stark ausgeprägt.<sup>9</sup> Dieser Teil liegt unter dem Niveau des Trommelfells.<sup>10</sup> Das große Hypotympanon liegt in der Bulla tympani und ist typisch für alle Nager.<sup>1,11</sup> Die relativen Größenverhältnisse innerhalb des Hypotympanons sind in Abb. 3 dargestellt.

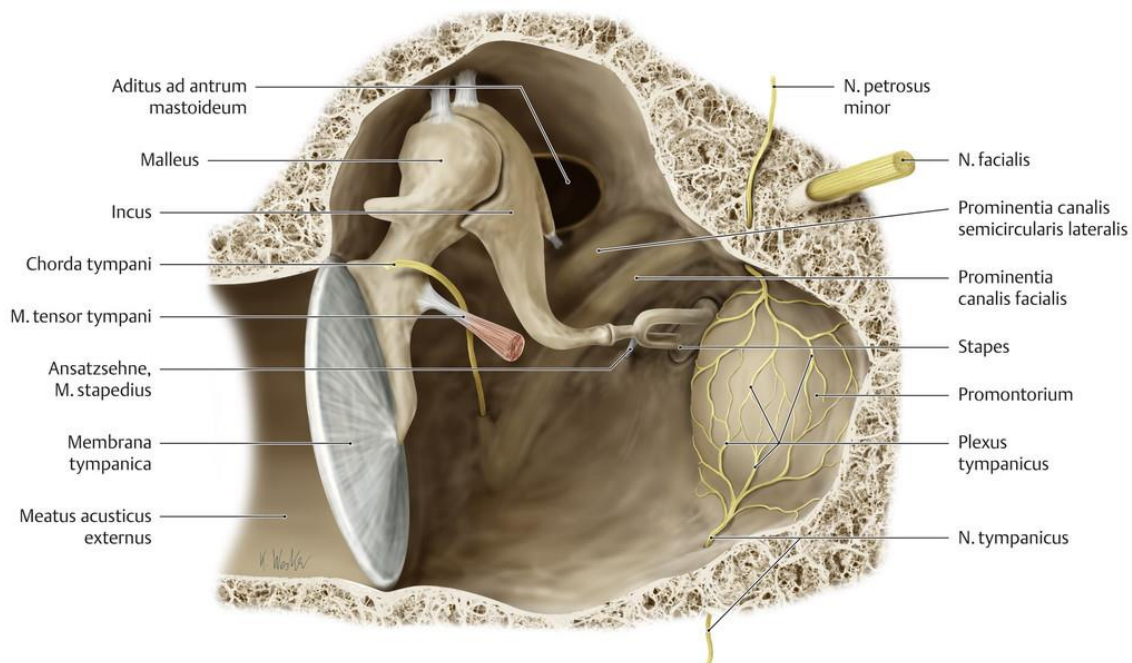


Abbildung 2: Cavitas tympani (ventrale Wand entfernt, linkes Ohr). Nach Schünke et al. 2009.

Im Kuppelraum (Epitympanon) liegt der Hammerkopf und Ambosskörper innerhalb des Recessus epitympanicus. Nach hinten öffnet sich das Epitympanon über den Aditus ad antrum in das Antrum mastoideum und von dort aus in die Cellulae mastoideae (angedeutet in Abb. 2).<sup>4</sup> Sie sind die umfangreichsten Paukennebenhöhlen, befinden sich im Processus mastoideus,



sind pneumatisiert und mit Schleimhaut ausgekleidet. Das Epitympanon ist vom Mesotympanon durch die Eminentia pyramidalis, ein knöcherner Kamm, der sich in den Hohlraum vorwölbt, getrennt.<sup>1</sup>

Das Mesotympanon ist als mittlerer Teil der Cavitas tympani gleichzeitig der engste Anteil. Lateral wird es vom Trommelfell begrenzt. Medial liegen das Promontorium, das ovale und runde Fenster und nach oben die Fazialiswulst (Prominentia canalis facialis), eine knöcherne Vorwölbung aufgrund des darunterliegenden N. facialis. Das Promontorium entsteht als Vorwölbung durch die Basalwindung der Schnecke; auf ihm liegt der Plexus tympanicus. Ventral stellt die Öffnung der Tuba auditiva die Verbindung zum oberen Anteil des Pharynx her. Außerdem liegt hier der Canalis caroticus. An der Hinterwand treten die Sehne des Musculus (M.) stapedius und die Chorda tympani aus.

Eine mit dem Periost verwachsene Schleimhaut kleidet die Cavitas tympani und die in ihr liegenden Gehörknöchelchen komplett aus. Das Epithel besteht aus vorwiegend einschichtigen, kubischen Zellen. Zur Tubenmündung hin können gehäuft zilienträgende und sekretorische Zellen auftreten.<sup>3</sup> Dieses sekretorische Epithel verursacht vermutlich zusammen mit dem Flimmerepithel der Tuba auditiva einen mukoziliären Transport, um die Cavitas tympani zu reinigen.<sup>12</sup>

In der Cavitas tympani werden sechs Wandabschnitte differenziert:<sup>4</sup>

1. Der Dachabschnitt (*Paries tegmentalis*) grenzt mit einer dünnen Knochenlamelle die Paukenhöhle zur mittleren Schädelgrube ab. In der verknöcherten *Fissura petrosquamosa* befindet sich ein Durchtrittspunkt für die *Arteria (A.) tympanica superior*.
2. Die Wand des Paukenkellers (*Paries jugularis*) ist der untere Abschnitt der Paukenhöhle und liegt nur als eine dünne Knochenlamelle trennend über dem *Bulbus superior* der *Vena (V.) jugularis interna*.
3. Über den *Aditus ad antrum mastoideum* an der hinteren Wand (*Paries mastoideus*) werden die *Cellulae mastoidea* im *Processus mastoideus* erreicht.
4. Die mediale Wand (*Paries labyrinthicus*) wird zum größten Teil vom Promontorium gebildet. Wie in Abb. 2 dargestellt liegt hier der *Plexus tympanicus*. Oberhalb des Promontoriums befindet sich das ovale Fenster (*Fenestra vestibuli*) mit der Steigbügelplatte (*Basis stapedis*), unterhalb liegt das runde Fenster (*Fenestra cochleae*) mit der *Membrana tympanica secundaria*. Die *Prominentia canalis facialis* ist eine Vorwölbung, in welcher der *N. facialis* im Fazialiskanal verläuft; sie befindet sich oberhalb des ovalen Fensters.
5. An der vorderen medialen Wand (*Paries caroticus*) liegt im unteren Teil die *A. carotis interna (Pars petrosa)*, die nur von einer dünnen Wand umgeben ist. Kleine Dehiszenzen in dieser Wand können dazu führen, dass das Gefäß direkt von der Schleimhaut des Mittelohrs bedeckt ist. Hier zweigen kleine Äste der *A. carotis interna* durch die *Canaliculi caroticotympanici* ab. Diese *Arteriae caroticotympanicae* werden von sympathischen *Nn. caroticotympanici* begleitet, die in den *Plexus tympanicus* strahlen. Oberhalb der *A. carotis* liegt der Eingang in die *Tuba auditiva* mit dem *M. tensor tympani*.
6. Das Trommelfell mit dem *Anulus fibrocartilagineus* begrenzt die laterale Seite (*Paries membranaceus*) der Paukenhöhle.

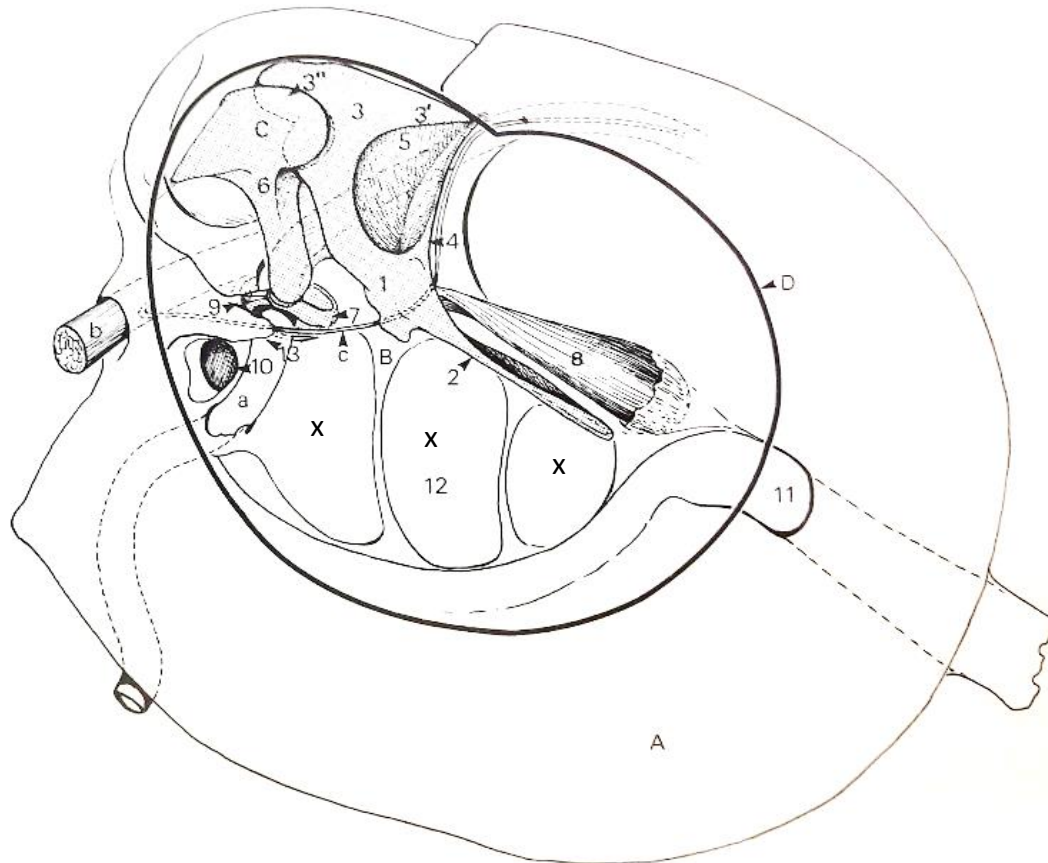


Abbildung 3: Rechtes Mittelohr einer Ratte (Schräg-Ansicht von rostro-latero-dorsal). Modifiziert nach Hebel und Stromberg 1995.

A: Hypotympanon, B: Mesotympanon, C: Epitympanon,  
D: Rand des Trommelfells

1: Malleus, 2: Manubrium, 3: Caput Mallei,  
3': Processus cephalicus, 3'': Art. incudomallearis,  
4: Processus folianus, 5: Lamina, 6: Incus, 7: Stapes,  
8: M. tensor tympani, 9: M. stapedius, 10: Fenestra  
rotundum, 11: Ostium tympanicum, 12: Promontorium,  
13: Eminentia pyramidalis

a: A. pterygopalatina, b: N. facialis, c: Chorda tympani,  
x: Anschnitte der Cochleagänge.

Die Gehörknöchelchenkette besteht aus Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes) und verbindet über die gelenkige Kette das Trommelfell mit der Fenestra vestibuli (auch Fenestra ovalis, ovales Fenster).<sup>8</sup> Auf der Abb. 3 ist zu sehen, wie die Gehörknöchelchen im Mittelohr zueinander stehen.<sup>1</sup> Zahlreiche Bänder befestigen sie untereinander und mit der Paukenhöhlenwand; sie schränken ihre Beweglichkeit ein. Die Muskeln der Gehörknöchelchen M. stapedius und M. tensor tympani sind v. a. funktionell für die Versteifung als

Schutzmechanismus und zur kontrollierten Schallübertragung relevant.<sup>4</sup> Der kegelförmige M. tensor tympani der Ratte hat seinen Ursprung dorsal des Promontoriums. Er erreicht über eine lange gespaltene Sehne den Processus muscularis des Hammers.<sup>13</sup> Der M. stapedius ist ein dünner, spindelförmiger Muskel, der von kaudal an einem kleinen Processus muscularis des Steigbügels ansetzt.<sup>1</sup>

Der Hammer wird in Kopf (Caput mallei), Hals (Collum mallei) und Manubrium mallei eingeteilt. Das Caput mallei besitzt eine sattelförmige Gelenkfläche und bildet damit die Articulatio (Art.) incudomallearis mit dem Corpus incudis.<sup>4</sup> Dieses Gelenk hat nur einen geringen Bewegungsumfang von 5°.<sup>14</sup>

Bei der Ratte hat der Hammer eine Länge von 3,5 mm, wobei das Manubrium mallei 2 mm lang ist. Der Winkel des Hammerstiels zur Horizontalen wird mit Durchschnittswerten von 25° beschrieben.<sup>15</sup>

Der Amboss besteht aus einem Corpus incudis und den beiden Fortsätzen Crus longum und breve. Das Kugelgelenk Art. incudostapedialis wird vom Processus lenticularis am Crus longum des Incus und der konkaven Knorpelpfanne am Caput stapedis gebildet. Auch dieses hat nur eine geringe Beweglichkeit.<sup>4</sup> Das Gelenk zwischen Amboss und Steigbügel weist bei der Ratte ein dazwischengeschaltetes Os lenticulare auf.<sup>1</sup>

Der Stapes ist aufgebaut wie ein Steigbügel und besitzt eine Fußplatte (Basis stapedis), einen vorderen und hinteren Schenkel (Crus anterius und posterius) und einen Kopf (Caput stapedis). Bei der Ratte ist der Steigbügel 0,8 mm hoch und seine Fußplatte bildet eine ovale Fläche mit einer Länge von 0,86 mm und einer Breite von 0,48 mm.<sup>1</sup> Die A. stapedialis verläuft zwischen den beiden Crura des Stapes; beim Menschen obliteriert sie nach der Embryonalphase.<sup>11,16</sup> Diese Arterie ist in Abb. 4 angeschnitten. Die Fußplatte ist durch das Ringband (Ligamentum anulare stapediale) in der Fenestra vestibuli fixiert und bildet eine Syndesmosis tympanostapedialis.<sup>4</sup>

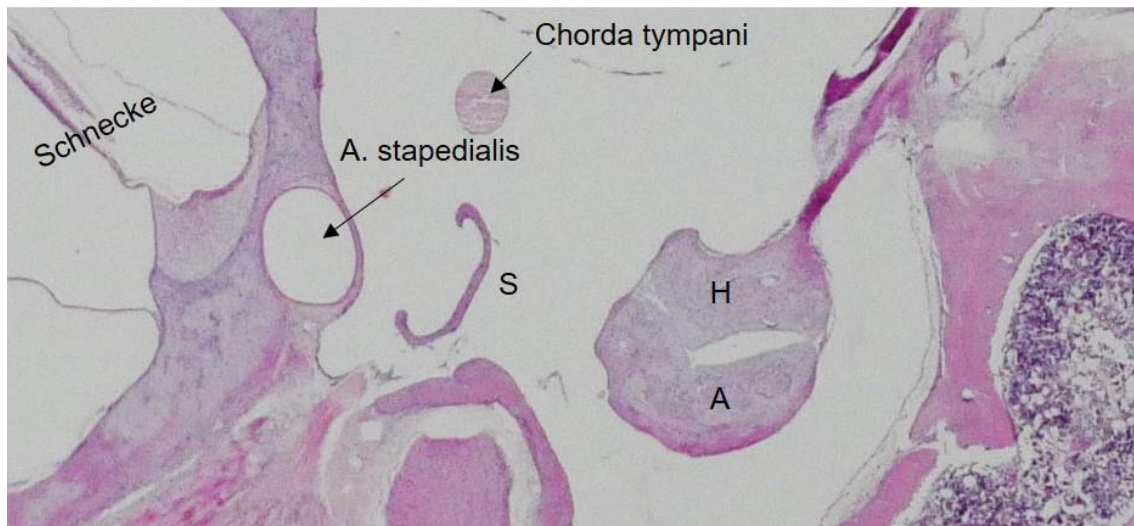


Abbildung 4: Gehörknöchelchen im Mittelohr. Eigener Befund.

Alle Gehörknöchelchen werden von derselben Schleimhaut umgeben, die auch die Paukenhöhle auskleidet. Über diese werden sie auch mit Blut versorgt. Teilweise gibt es Schleimhautbrücken und -falten. In einer dieser Schleimhautbrücken verläuft die Chorda tympani.

Rostroventral liegt die Öffnung in die Tuba auditiva, die bei der Ratte insgesamt etwa 4,5 mm lang ist. Dabei setzt sie sich aus dem medialen etwa 1,5 mm langen, membranösen Anteil und einem 3 mm langen knöchernen Anteil zusammen, der lateral liegt.<sup>1</sup> Die Tuba auditiva verläuft bei der Ratte nahezu horizontal und verbindet die Paukenhöhle mit dem Nasenrachenraum.<sup>17</sup> Sie gewährleistet eine regelmäßige Belüftung der Paukenhöhle mit Atemluft und gleicht die Druckunterschiede bei einem schwankenden äußeren Luftdruck aus.<sup>4</sup>

Die Schleimhaut der Ohrtrumpete besteht aus mehrreihigem Flimmerepithel. Bei Ratten wird eine hohe Zahl an Becherzellen und einige muköse Drüsen (Gll. tubariae) in der Tuba auditiva beschrieben.<sup>17</sup>

### 1.1.1.3 Innenohr

Das Hörorgan ist mit dem Gleichgewichtsorgan im Innenohr vereint. Das Innenohr besteht aus dem inneren Gehörgang (Meatus acusticus internus) und dem sehr komplex aufgebauten knöchernen und häutigen Labyrinth (Labyrinthus osseus und membranaceus). Die Schnecke (Cochlea) enthält das Sinnesepithel für den Hörsinn; die drei Bogengänge (Canales semicirculares), sowie Sacculus und Utriculus enthalten die Sinneszellen für den Gleichgewichtssinn. Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nicht weiter auf die Funktionsweise dieser Zellen eingegangen werden.

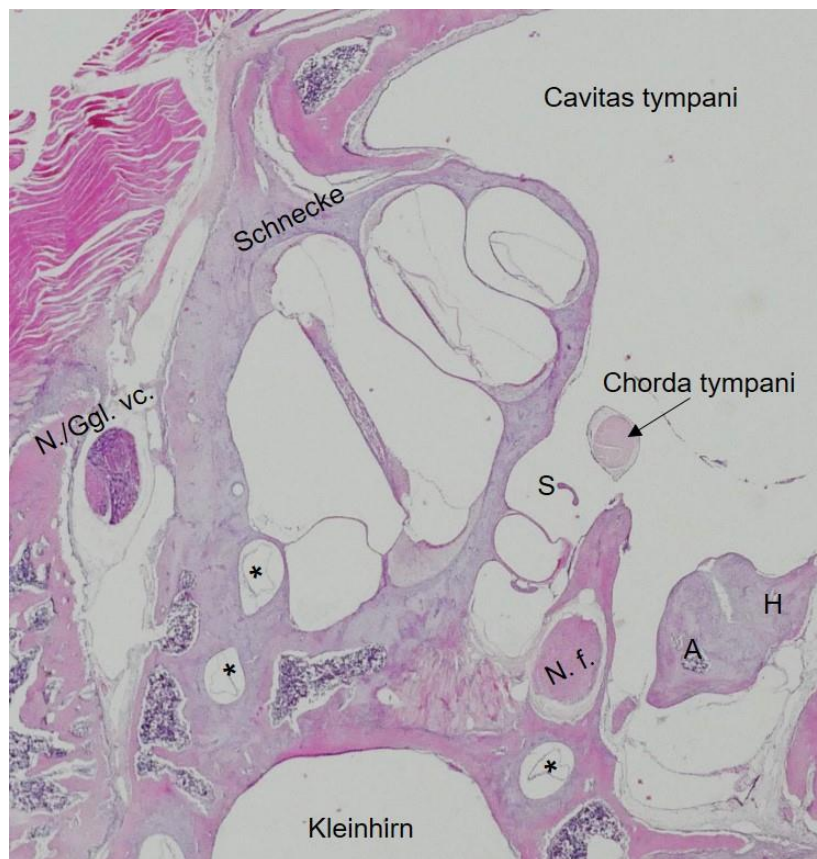


Abbildung 5: Innenohr. Eigener Befund.

A: Amboss, H: Hammer, \*: Anschnitt  
eines Bogengangs, S: Stapes,  
N. f.: N. facialis,  
N./Ggl. vc.: N./Ggl. vestibulo-cochlearis.

In den Labyrinthvorhof (Vestibulum labyrinthi) münden die Schnecke und die fünf Öffnungen der Bogengänge.<sup>8</sup> Das ovale Fenster in seiner lateralen Wand stellt

die Verbindung über den Stapesfuß mit dem Mittelohr dar. Die drei knöchernen Bogengänge (Canales semicirculares ossei) stehen fast senkrecht aufeinander und sind um ca. 30° bis 45° gegen die drei Hauptrichtungen im Raum versetzt. In der Pars mastoidea der Paukenhöhle bildet der Canalis semicircularis lateralis eine Vorwölbung (s. Abb. 2).<sup>18</sup>

Abbildung 5 zeigt Anschnitte der Bogengänge und die Cochlea. Die knöchernen Schnecke hat ihre Basis zum Meatus acusticus internus gerichtet. Der Schneckenkanal (Canalis spiralis cochleae) hat 2,5 Windungen beim Menschen; bei der Ratte werden in unterschiedlichen Quellen 1,5 bis 2,5<sup>19</sup>, 2,25<sup>20</sup> oder drei Windungen<sup>21</sup> beschrieben; die eigenen Beobachtungen sprechen für mindestens 2,5 Windungen. Die Achse wird vom Modiolus gebildet, der eine Aushöhlung für das Ganglion (Ggl.) cochleare besitzt. In diesem befinden sich bipolare Nervenzellen. Eine dünne Knochenleiste, die Lamina spiralis ossea windet sich um den Modiolus und besteht aus zwei Lamellen, zwischen denen die Nervenfasern aus dem Ggl. cochleare verlaufen. Über die Steigbügelplatte im ovalen Fenster werden die Schwingungen auf die Perilymphe in der Scala vestibuli weitergegeben. Diese Wellenbewegungen wandern entlang der Basilarmembran, wodurch Scherkräfte auf die Zilien der Sinneszellen im Corti-Organ wirken. Diese werden in ein Rezeptorpotenzial umgewandelt.

Die Strukturen für den Gleichgewichtssinn setzen sich aus Sacculus, Utriculus und drei Ductus semicirculares zusammen. Funktionell werden Linearbewegungen und Winkelbeschleunigungen wahrgenommen. Die bipolaren Ganglienzellen liegen im Ggl. vestibulare und sind mit ihren Dendriten für die afferente Innervation zuständig. Der N. vestibularis wird aus den Axonen der Ganglienzellen gebildet. Dieser vereinigt sich mit dem N. cochlearis zum N. vestibulocochlearis, welcher in das zentrale Nervensystem (ZNS) projiziert.<sup>3</sup>

#### 1.1.1.4 Nerven- und Gefäßverläufe

Der N. facialis (VII. Hirnnerv) erreicht das Os temporale über den Porus acusticus internus und verläuft im Canalis n. facialis bis zum Foramen stylomastoideum. Er knickt in seinem Verlauf rechtwinklig von vorne nach hinten ab (Fazialisknie) und zieht in einem Bogen um die Paukenhöhle nach kaudal.<sup>22</sup> Noch im knöchernen Fazialiskanal werden der N. intermedius und N. stapedius, welcher den gleichnamigen Muskel versorgt, abgegeben. In Abb. 6 ist der N. und M. stapedius angedeutet. Die beiden Hauptäste des N. intermedius sind der N. petrosus major und die Chorda tympani. Die Chorda tympani zieht durch den Canaliculus chordae tympani in die Paukenhöhle und verläuft dort in Schleimhautfalten (Plica malleares anterior und posterior) zwischen dem Manubrium mallei und dem Crus longum des Amboss einmal quer über das Trommelfell. Die Cavitas tympani verlässt sie durch die Fissura petrotympanica und gelangt über den N. lingualis als Leitstruktur zu ihren Innervationsgebieten. Ihr Verlauf ist in der Abb. 6 für den Menschen dargestellt. Der N. petrosus major steht über einen R. communicans mit dem Plexus tympanicus in Verbindung.<sup>23</sup>

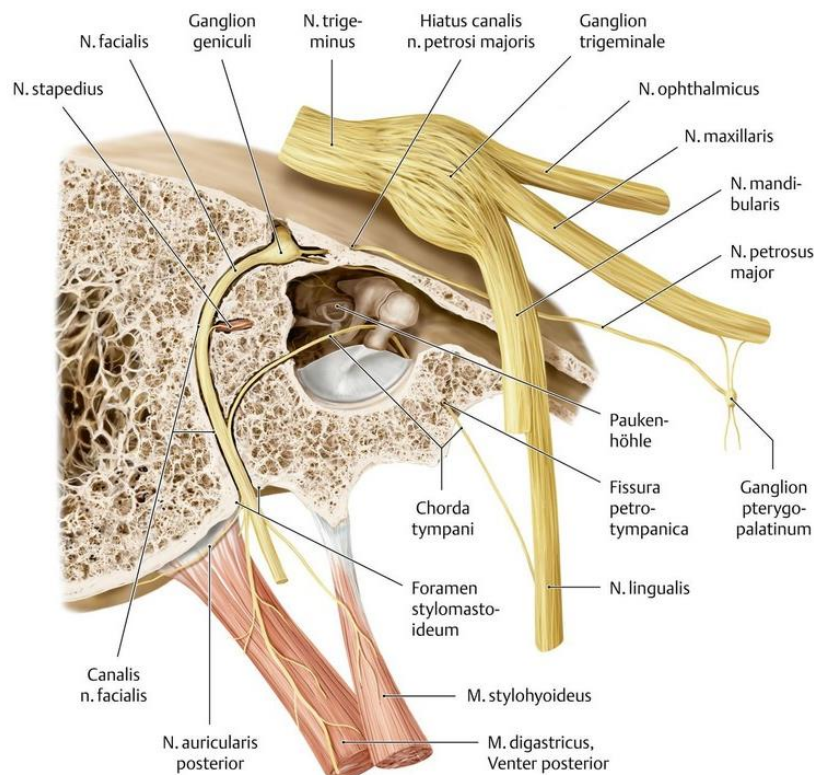


Abbildung 6: Verlauf des N. facialis. Nach Schünke et al. 2018.



Der N. vestibulocochlearis (VIII. Hirnnerv) besteht aus zwei Anteilen: Der N. cochlearis wird von Axonen der Nervenzellen des Ggl. cochleare, welches im Modiolus liegt, gebildet und verläuft durch den Meatus acusticus internus. Er schließt sich dem N. vestibularis an, um kaudal des N. facialis in den caudalen Pons einzutreten.<sup>1</sup> Die Zellkörper der bipolaren Neurone, die den N. vestibularis in erster Linie bilden, liegen im Ggl. vestibulare. Dieses liegt am Boden des Meatus acusticus internus. Der Nerv leitet die Informationen über seine Fortsätze aus dem Gleichgewichtsorgan des Innenohrs weiter. Die peripheren Fasern der bipolaren Neurone im Ggl. cochleare ziehen zum Corti-Organ.<sup>24</sup> Auf die Nennung weiterer Spezifika soll hier verzichtet werden.

Der N. glossopharyngeus (IX. Hirnnerv) verlässt den Hirnstamm am Sulcus posterolateralis und zieht durch das Foramen jugulare (Foramen lacerus posterius) aus dem Schädel. Dort bildet er zwei Ganglien: das Ggl. superius liegt noch in der Schädelhöhle, das Ggl. inferius liegt außerhalb. Die präganglionären parasymphatischen Fasern bilden direkt kaudal des Ggl. inferius den N. tympanicus und gelangen mit diesem über den Canaliculus tympanicus ins Mittelohr.<sup>25</sup> Dort bilden sie nach der gegenwärtigen Lehrmeinung unter der Mittelohrschleimhaut zusammen mit den Nn. caroticotympatici den Plexus tympanicus. Für die sensorische und sekretorische Innervation der Schleimhaut der Tuba auditiva bildet sich aus dem Plexus tympanicus der R. tubarius.<sup>24</sup> Aus dem Plexus formiert sich der N. petrosus minor mit sekretorischen Fasern überwiegend für die Innervation der Glandula (Gl.) parotidea. Dieser zieht weiter zum Ggl. oticum (Jacobson-Anastomose).<sup>23,26</sup> Dort erfolgt die Umschaltung auf die postganglionären parasymphatischen Fasern.<sup>27</sup> Neben dem N. tympanicus gibt der N. glossopharyngeus noch weitere Äste ab, z. B. die Rr. pharyngei, Rr. tonsillares oder die Rr. linguales, die jedoch keine Beziehung zum Plexus tympanicus besitzen.<sup>24</sup>

Die A. carotis communis teilt sich ventral der auditorischen Bulla in die A. carotis externa und A. carotis interna auf. Der Hauptstamm der A. carotis interna gelangt zur Versorgung des Gehirns über den Canalis caroticus in den Schädel, während die A. stapedia (auch A. stapediale), ein Ast der A. carotis interna, in das Mittelohr zieht.<sup>28</sup> Die A. stapedia verläuft im Mittelohr zwischen den beiden Stapeschenkeln. Beim Menschen und vielen anderen Säugetieren obliteriert sie

vollständig. Weitere Äste der A. carotis interna sind die Rr. caroticotympanici, die mit den Ästen der A. carotis externa anastomosieren. Größtenteils wird das Mittelohr von der A. carotis externa und ihren Ästen versorgt. Die A. tympanica anterior läuft durch die Fissura petrotympanica, die A. tympanica inferior erreicht das Mittelohr zusammen mit dem N. tympanicus durch den Canaliculus tympanicus und die A. tympanica superior durch den Canalis n. petrosi minoris. Die A. stylomastoidea ist ein Ast der A. auricularis posterior und verläuft durch das gleichnamige Foramen und den Canalis n. facialis.

Das venöse Blut fließt über den Plexus pharyngeus und die V. meningea media in die V. jugularis interna ab. Über die Gefäßplexus, die die Hirnnerven begleiten, besteht eine Verbindung zu den Sinus durae matres.<sup>24</sup>

### 1.1.2 Der Plexus tympanicus

Die ersten Beschreibungen des N. tympanicus stammen aus dem Jahr 1813 von Ludwig Levin Jacobson. So wird der N. tympanicus als Ast des N. glossopharyngeus nach seinem Entdecker auch Jacobson-Nerv oder N. Jacobsonii benannt.<sup>29</sup> Es folgte die Erforschung der anatomischen Strukturen, deren Beziehungen zueinander und deren physiologische Funktionen. In den Aufzeichnungen werden sowohl der Canaliculus tympanicus, ein knöcherner Kanal im Felsenbein, in dem der N. tympanicus verläuft, als auch der Plexus tympanicus nach Jacobson benannt.<sup>23</sup> Der Jacobson-Plexus wird als Nervengeflecht beschrieben, welches auf dem Promontorium des Mittelohrs liegt und Nervenfasern aus drei Quellen enthält: Vom N. tympanicus, von Ästen des N. facialis und von sympathischen Fasern aus dem Plexus caroticus. Das Geflecht lässt sich sowohl in der Schleimhaut der Paukenhöhle als auch im knöchernen Anteil der Eustachi'schen Röhre finden. Diese Beschreibungen aus dem Jahr 1818 bildeten eine Grundlage für die weitere Erforschung des Plexus tympanicus.<sup>29</sup>

1870 wird die Lage des N. tympanicus im Sulcus promontorii und seine Bedeutung als stärkster Eingangsnerv des Plexus tympanicus beschrieben. Es wird angemerkt, dass der Plexus tympanicus trotzdem keinesfalls als „periphere Ausstrahlung des Glossopharyngeus“ angesehen werden darf.<sup>30</sup>

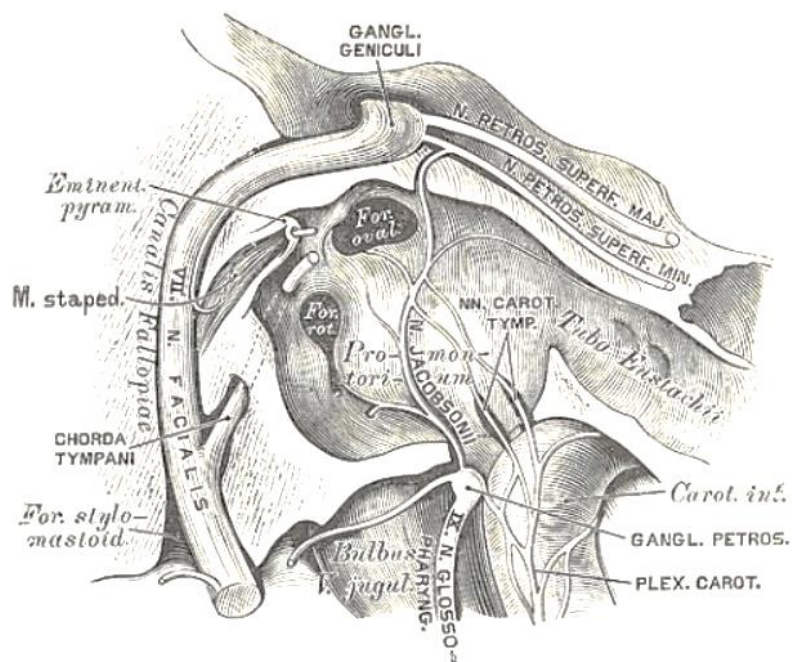


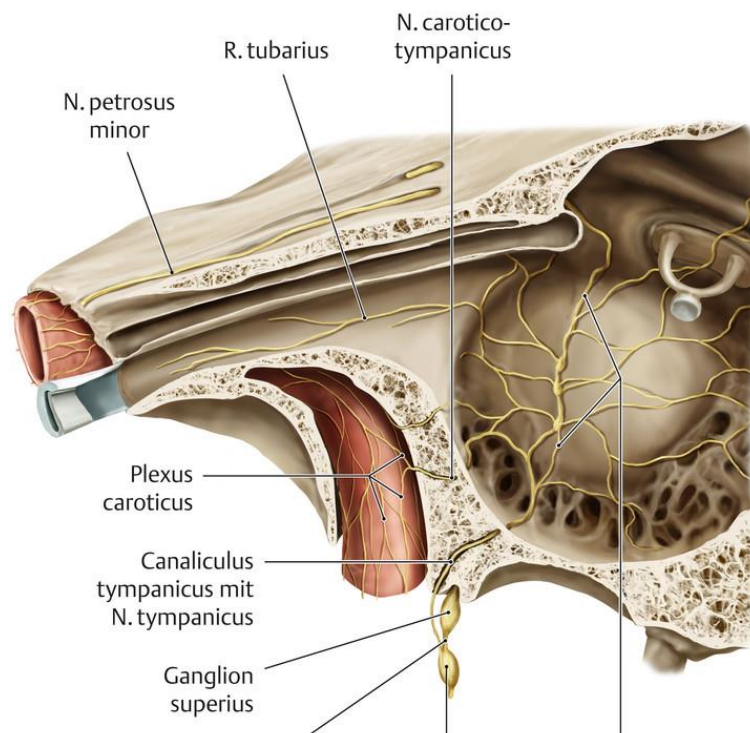
Abbildung 7: Der Nervus Jacobsonii in der Paukenhöhle. Nach Heitzmann 1885.

Die Abb. 7 aus dem Übersichtswerk „Die descriptive und topographische Anatomie des Menschen“ aus dem Jahr 1885 zeigt das Ggl. petrosum (= Ggl. inferius n. glossopharyngei) als Ursprung des N. Jacobsonii. Ferner wird seine Ausbreitung bis zur Tuba Eustachii, zum Foramen ovale und Foramen rotundum gezeigt sowie die Verbindung zu den Nn. caroticotympanici des Plexus caroticus. Auch der Zusammenschluss der Fasern aus dem Plexus zum N. petrosus (superficialis) minor ist abgebildet.<sup>31</sup>

Nach diesem historischen Exkurs in die Entdeckung des Plexus tympanicus wird im Folgenden seine Anatomie nach dem heutigen Stand möglichst genau dargestellt.

Der Plexus tympanicus beschreibt ein vegetatives Nervengeflecht in der Mittelohrschleimhaut, welches sich aus unterschiedlichen Nervenfasern zusammensetzt und sich v. a. in der Submukosa und in Sulci bzw. Knochenkanälchen über dem Promontorium in der medialen Wand der Cavitas tympani verzweigt.<sup>32,33</sup> Das Mittelohr stellt somit einen wichtigen Ort im Kopfbereich dar, an dem zahlreiche vegetative Nervenfasern unterschiedlichen Ursprungs aufeinander treffen oder sich kreuzen.<sup>34,35</sup>

Einen großen Anteil des Plexus tympanicus bildet ein Ast des N. glossopharyngeus (IX. Hirnnerv): der N. tympanicus. Die Nervenfasern haben ihren Ursprung im Nucleus (Ncl.) salivatorius inferior und verlaufen im N. glossopharyngeus zum Foramen jugulare.<sup>25</sup> Wie in Abb. 8 für den Menschen dargestellt verlässt der N. tympanicus den N. glossopharyngeus am Ggl. inferius und erreicht durch den Canaliculus tympanicus die mediale Wand der Cavitas tympani.<sup>36-38</sup> Im Canaliculus tympanicus verläuft der Nerv zusammen mit der A. tympanica inferior. Der Knochenkanal liegt medial des Foramen stylomastoideum und zwischen der Fossa jugularis mit der V. jugularis interna und dem Canalis caroticus, der die A. carotis interna enthält.<sup>23,25,26</sup>



*Abbildung 8: Der Plexus tympanicus. Nach Schünke et al. 2018.*

Das Promontorium erreicht er anterior der unteren Grenze des runden Fensters.<sup>39</sup> Dabei liegen die Nervenfasern tief in der Schleimhaut, direkt auf dem Knochen oder in Knochenrinnen. In einer Analyse von Allam wird der Nerv in 20 Prozent (%) der Fälle in einem Knochenkanal beschrieben.<sup>39</sup> Die Häufigkeitsangaben zum Verlauf in einem Knochenkanal differieren in den verschiedenen Studien stark; dies kann auch durch Altersunterschiede bedingt sein.<sup>32,40,41</sup> Der N. tympanicus gibt während seines Verlaufs zahlreiche Äste ab,

die jedoch sehr variabel sind.<sup>42</sup> Folgende Äste konnten regelmäßig gefunden werden: ein größerer Ast führt direkt zur Eustachi'schen Röhre, kleinere Äste zum runden und ovalen Fenster und zu den Mastoidzellen.<sup>26,34</sup> Es besteht eine hohe Variabilität bezüglich der Nervenäste, Anastomosenbildung, Lokalisation und Verlauf. Jeder Plexus ist einzigartig und selbst im Seitenvergleich besteht keine Symmetrie.<sup>23,26</sup>

Der N. tympanicus besitzt unterschiedliche Qualitäten. Es werden sekretomotorische und vasodilatatorische Fasern beschrieben.<sup>33</sup> Zum einen führt er präganglionäre parasymphatische Fasern für die Innervation der Gl. parotidea, zum anderen sensible Fasern für die Innervation der Mittelohrschleimhaut (Rr. tympanici) und der Tuba auditiva (R. tubarius). Auch die Innenseite des Trommelfells wird vom N. tympanicus innerviert.<sup>43</sup> Die sensiblen Perikaryen können eine Verdickung am Nerven verursachen, die Intumescencia tympanica bzw. Ggl. tympanicum genannt wird.

Die präganglionären parasymphatischen Fasern ziehen als N. petrosus minor durch die Fissura sphenopetrosa zum Ggl. oticum, welches die Perikaryen der postganglionären parasymphatischen Axone enthält. Diese parasymphatischen Fasern benutzen als R. communicans den N. auriculotemporalis als Leitschiene und erreichen darüber die Gl. parotidea. Ein weiterer Ast des Plexus tympanicus, der R. tubarius, führt sensible Fasern zur Schleimhaut der Tuba auditiva. Ein weiterer R. communicans steht in Verbindung mit dem N. petrosus major.<sup>44</sup> Im Mittelohr konnten ektope Ganglienzellen auf dem Promontorium und im submukösem Bindegewebe nachgewiesen werden.<sup>45</sup>

Aus dem Plexus caroticus internus, ein perivaskulärer Plexus um die A. carotis interna, erreichen postganglionäre sympathische Fasern über die Nn. caroticotympanici den Plexus tympanicus.<sup>44</sup> Diese sympathischen Fasern haben ihren Ursprung im Ggl. cervicale superius und ziehen in den Canaliculi caroticotympanici vom Canalis caroticus in die Cavitas tympani (s. Abb. 8). Die parasymphatischen Fasern des N. tympanicus formen mit den sympathischen Nervenfasern der Nn. caroticotympanici den vegetativen Plexus tympanicus.<sup>23,26</sup>

Der N. petrosus minor verbindet den Nervus bzw. Plexus tympanicus mit dem Ggl. oticum (Jacobson-Anastomose). Zusätzlich bestehen Verbindungen zum

N. petrosus major und damit zum N. facialis und zu den sympathischen Fasern aus dem Plexus caroticus.<sup>34</sup>

Die Details dieser Verbindungen und deren Funktionalität sind jedoch nicht hinreichend bekannt.

### 1.1.3 Der Plexus tympanicus als Komponente des vegetativen Nervensystems

In diesem Abschnitt soll eine allgemeine Übersicht über die Organisation des cranialen vegetativen Nervensystems gegeben werden, um dessen anatomischen Aufbau und Funktion zu erklären. Auf detaillierte Verschaltungsmuster und Gebiete außerhalb des Kopfbereichs wird nicht genauer eingegangen.

Generell gehört das sympathische und parasympathische System zum autonomen Nervensystem (ANS).<sup>24</sup> Dabei unterscheiden sich Sympathikus und Parasympathikus v. a. in ihrer Funktion, ihrer Lokalisation und ihren Neurotransmittern. Andere Begriffe für das ANS sind viszerales oder vegetatives Nervensystem. Autonomes Nervensystem wird es genannt, da es selbstständig und unbewusst arbeitet.<sup>4</sup> Das ANS bildet zusammen mit dem sensomotorischen System, welches die Skelettmuskulatur und das entero- und exterozeptive Sensorium versorgt, das periphere Nervensystem (PNS).<sup>46</sup> Diese Begrifflichkeiten sind nicht unumstritten, da in der Körperperipherie zahlreiche autonome Netzwerke existieren (z. B. enterisches Nervensystem) und Sympathikus und Parasympathikus auch zentralnervös repräsentiert sind. Sicherlich ist daher der Begriff *Vegetatives Nervensystem* dem Begriff *Autonomes Nervensystem* überlegen und wird deshalb in dieser Arbeit bevorzugt.

Die komplexen vegetativen Aktivitäten können nur auf der Basis einer gut ausbalancierten Physiologie ausgeführt werden. Für diese Balance des inneren Milieus sorgt das vegetative Nervensystem über eine Vielzahl von Regelkreisen.<sup>47</sup> Als zentrale Kontrollinstanz steuert das ANS beispielsweise

Funktionen wie Blutdruck, Herzschlag, Atemfrequenz, Sexualfunktion, zirkadiane Rhythmen und das Immunsystem. Außerdem innerviert es Drüsen, die Muskulatur der Blutgefäße, der Eingeweide und der Haare (Musculi arrectores pili), das Herz und die Geschlechtsorgane.

Neben der Regulation von lebenserhaltenden Funktionen sorgt das ANS in annähernd allen funktionalen Bereichen des Organismus für eine Balance zwischen Erholung und maximaler Leistungsfähigkeit. Das ANS interagiert sehr stark mit dem somatischen Nervensystem und beide können nur in dieser Wechselbeziehung optimal funktionieren. Die viszeroafferente Neurone haben ihre Perikaryen in den Spinalganglien und den Kopfganglien. Die zentripetalen Fortsätze ziehen weiter zum Rückenmark und in vegetative Zentren im Gehirn. Die zentrifugalen Fortsätze ziehen mit den Hirnnerven zu ihren Zielorganen oder verlaufen mit den Ästen des Sympathikus zu den peripheren Organen.

Nach der gegenwärtig noch gültigen Modellvorstellung haben die Viszeroafferenzen ihren Ursprung zentral und werden peripher in sympathischen und parasympathischen Ganglien (Ganglia autonoma) synaptisch umgeschaltet. Es wird zwischen präganglionären und postganglionären Nerven unterschieden. Nach der Umschaltung ziehen die Fortsätze der postganglionären Neurone zu ihrem Zielorgan. Die Umschaltung von prä- auf postganglionäre Neurone erfolgt im sympathischen Nervensystem organfern, während im parasympathischen Nervensystem die Umschaltung organnah, teilweise sogar in Ganglienzellen in der Wand des Erfolgsorgans erfolgt. Ein weiterer Unterschied besteht zwischen den Transmittern des zweiten Neurons. Die Übertragung beim ersten Neuron erfolgt in beiden Systemen mittels Acetylcholin. Das zweite Neuron vermittelt seine Wirkung im Parasympathikus über Acetylcholin und im Sympathikus über Noradrenalin.<sup>4</sup>



Die folgende Abb. 9 stellt die modellhafte Umschaltung vom zweineuronalen Sympathikus und Parasympathikus im Vergleich zum somatischen Neuron, welches ohne Unterbrechung sein Erfolgsorgan erreicht, vereinfacht dar.

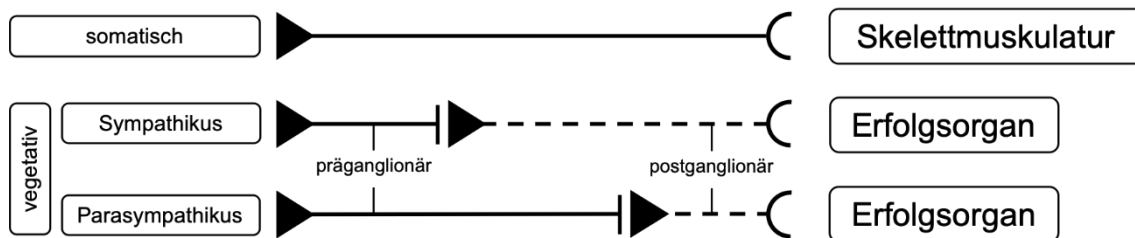


Abbildung 9: Efferente Strecke somatischer und vegetativer Nerven. Modifiziert nach Schiebler et al. 2007.

Der Begriff Neurotransmission wurde entscheidend von Henry Dale und Otto Loewi geprägt, die für ihre „Entdeckungen zur chemischen Übertragung von Nervenimpulsen“ den Medizinnobelpreis 1936 erhielten.<sup>48</sup> Nach Dales Forschungen wurden Begriffe wie cholinerge und adrenerge Substanzen mit den sympathischen und parasympathischen Systemen verknüpft.<sup>49</sup> Die beiden von Loewi noch als „Vagusstoff“ und „Acceleranstoff“ bezeichneten Transmitter wurden als Acetylcholin und Adrenalin erkannt und stellen die Neurotransmitter im vegetativen Nervensystem dar.<sup>50</sup>

Neurotransmitter (hergeleitet aus dem Altgriechischen νεῦρον = neuron „Sehne, Nerv“ und dem Lateinischen *transmittere* „hinüber schicken, übertragen“) sind Botenstoffe, die Erregungen von einem Neuron über die Nervenzellendigung auf eine andere Nervenzelle übertragen können. Eine präsynaptische Erregung wird über die Ausschüttung eines Neurotransmitters und das Andocken an einen Rezeptor an der Postsynapse zu einer postsynaptischen Erregung.

Lange bestand das Dale-Prinzip, was von Eccles 1954 aufgrund eines Vortrags von Dale aus dem Jahr 1934 beschrieben wurde. Dale postulierte, dass ein Neuron als Botenstoff genau einen Neurotransmitter (*one neuron – one transmitter*) ausschüttet.<sup>51</sup> Dieses Prinzip wurde erst von Hökfelt 1977 widerlegt (Koexistenzprinzip).<sup>52</sup> Es wurde vielfach nachgewiesen, dass Neurotransmitter sehr häufig zusammen mit anderen Neurotransmittern und -peptiden in Nervenzellen vorkommen, welche auch als Kotransmitter bezeichnet werden können. Typische Konstellationen sind Paarungen von Noradrenalin und

Neuropeptid Y (NPY) oder Acetylcholin und Vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP) bzw. Substanz P (SP).<sup>53,54</sup>

Eingeteilt werden können Transmitter in inhibitorische oder exzitatorische Transmitter. Ob ein Transmitter hemmend oder aktivierend ist, hängt maßgeblich vom Rezeptor an der Postsynapse ab. So kann z. B. Noradrenalin, je nach Rezeptortyp ( $\alpha$ -/ $\beta$ -Rezeptor), auf glatte Muskelzellen relaxierend oder kontrahierend wirken. Acetylcholin ist stets ein exzitatorischer Transmitter.

Im vegetativen Nervensystem spielt Acetylcholin als Überträgerstoff im sympathischen und parasympathischen Nervensystem eine wichtige Rolle. Im zweiten sympathischen Neuron stellt zumeist Noradrenalin den Transmitter am Wirkort dar.

1934 benannte Dale zum ersten Mal Neurone nach ihren Transmittern. So beschrieb er parasympathische Fasern mit dem Transmitter Acetylcholin als „cholinerg“ und sympathische Fasern als „adrenerg“, da zu dieser Zeit Adrenalin als Haupttransmitter im sympathischen Nervensystem angenommen wurde.<sup>49</sup> Neurone, die Adrenalin oder Noradrenalin als Überträgersubstanz benutzen, werden immer noch adrenerg genannt. Genauso werden Neurone mit Acetylcholin als Transmitter als cholinerge Neurone bezeichnet.

In dieser Arbeit werden für die immunocytochemischen Untersuchungen des sympathischen und parasympathischen Nervensystems Antikörper (AK) benutzt, die gegen Enzyme gerichtet sind, die in der Synthese der Transmitter entscheidend sind. Dabei geben AK, die gegen Cholin-Acetyl-Transferase gerichtet sind, Aufschluss über die Lokalisation von Acetylcholin und damit von cholinergen Neuronen und Anti-Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase über die Lokalisation von Noradrenalin und somit von adrenergen Neuronen.<sup>55</sup>

### *Der sympathische Anteil im vegetativen Nervensystem (ANS)*

Die ersten Neurone des Sympathikus liegen im thorakolumbalen Bereich des Rückenmarks in den Segmenten Th1 bis L2 in den Ncl. intermediolaterales der Seitenhörner. Die Axone dieser Neurone sind die präganglionären myelinisierten Fasern, die als R. communicans albus aus dem Spinalnerv zu den Grenzstrangganglien ziehen und dort mit ihrem Transmitter Acetylcholin an den Synapsen auf das zweite sympathische Neuron wirken. Neben den paravertebralen Ganglien, die den Grenzstrang (Truncus sympathicus) auf beiden Seiten der Wirbelsäule bilden, gibt es noch unpaare prävertebrale Ganglien, in denen ebenfalls Verschaltungen stattfinden. Nach der synaptischen Umschaltung in den beschriebenen Ganglien ziehen die postganglionären unmyelinisierten Nervenfasern entweder als R. communicans griseus zurück zu den Spinalnerven und erreichen ihre Zielgebiete in der Rumpfwand und den Extremitäten oder sie ziehen als Nn. splanchnici etc. zu den inneren Organen. Erfolgt die Umschaltung in prävertebralen Ganglien oder teilweise auch in den paravertebralen Ganglien, ziehen die postganglionären Nervengeflechte, sogenannte Plexus (abgeleitet vom lateinischen *plexus* – Geflecht), deren Fasern auch mit arteriellen Gefäßen verlaufen können, weiter zu ihren Zielorganen.<sup>4,24</sup> Der Transmitter des zweiten sympathischen Neurons ist in der Regel Noradrenalin. Eine Ausnahme stellen die Fasern zu den Schweißdrüsen dar, die genauso wie die präganglionären Fasern Acetylcholin als Neurotransmitter ausschütten.<sup>56</sup>

Die übergeordnete Wirkung des Sympathikus ist eine schnelle Reaktion auf Reizkonstellationen, die den Organismus gefährden. Dazu gehören Herzfrequenz-, Atemfrequenz- und Blutdrucksteigerungen, eine erhöhte Schweißabsonderung und ein Herunterregulieren der Magen-Darm-Aktivität, um dem Kampf- oder Fluchtverhalten zu genügen.<sup>24,46,57</sup>

### *Der parasympathische Anteil im vegetativen Nervensystem (ANS)*

Der Parasympathikus hat allgemein betrachtet eine dem Sympathikus entgegengesetzte Wirkung. Es stehen v. a. erholungsfördernde Funktionen und Verdauungsprozesse im Vordergrund wie z. B. eine Verringerung der Herz- und Atemfrequenz und eine vermehrte Aktivität des Magen-Darm-Trakts. Sympathikus und Parasympathikus stehen in einer Balance, in der der eine Part in seiner Aktivität nachlässt sobald der andere Part stark überwiegt. Somit ist ein Ausgleich zwischen Regeneration und Leistungsfähigkeit gegeben.<sup>24</sup>

Die ersten Neurone des Parasympathikus sind in Kerngebieten in kraniosakralen Regionen lokalisiert; zu großen Teilen befinden sie sich im Hirnstamm und in den sakralen Rückenmarkssegmenten S2 bis S4. Die Perikaryen des kranialen Anteils liegen in den Hirnnervenkernen der Hirnnerven N. oculomotorius (III. Hirnnerv), N. facialis (VII. Hirnnerv), N. glossopharyngeus (IX. Hirnnerv) und N. vagus (X. Hirnnerv). Die präganglionären Fasern ziehen mit den Hirnnerven zu folgenden Ganglien der jeweiligen Hirnnerven: Ggl. ciliare, Ggl. pterygopalatinum, Ggl. oticum und Ggl. submandibulare. Im sakralen Anteil ziehen sie als Nn. splanchnici pelvici zu den Ganglia pelvica oder direkt intramural in die Zielgebiete. Der Neurotransmitter in den prä- und auch in den postganglionären Nervenzellen ist Acetylcholin.

Die Verschaltung des Parasympathikus liegt wie in der Abb. 9 ersichtlich wesentlich weiter in der Peripherie, teilweise sogar im Erfolgsorgan selbst.

### *Das vegetative Nervensystem (ANS) des Kopfbereichs*

Im Bereich des Kopfes werden alle sympathisch innervierten Zielstrukturen über Gefäßplexus erreicht. Den gegenwärtigen Modellvorstellungen entsprechend lagern sich postganglionäre Fasern aus dem Ggl. cervicale superius der Wand der A. carotis communis an, wo sie den Plexus caroticus bilden.

Für diese Arbeit ist der Plexus caroticus besonders relevant. Seine Nervenfasern begleiten die sich immer weiter verzweigenden Arterienäste aller Organe des Kopfes. An einzelnen Abschnitten verlassen kleine, kompakte Nervenäste die Gefäßplexus, um in periphere Ganglien, wo sie jedoch nicht weiter verschaltet werden sollen, zu gelangen. Der Plexus tympanicus wird von kleinen Nn. caroticotympatrici erreicht, die im Canalis caroticus abzweigen.

#### *1.1.3.1 Adrenerge Systemkomponenten*

Der Transmitter des postganglionären sympathischen Systems ist Noradrenalin; er gehört zusammen mit Dopamin und Adrenalin zu den Katecholaminen. Die primären Erkenntnisse über den Neurotransmitter Noradrenalin, dessen Synthese und Vorkommen sind v. a. Euler, Holtz und Vogt zu verdanken.<sup>58-61</sup>

Noradrenalin wird in sympathischen Nervenendigungen der Peripherie des Körpers und im zentralen Nervensystem hergestellt.<sup>62</sup> Neben seiner Aufgabe als Transmitter im vegetativen Nervensystem wirkt Noradrenalin auch als Hormon. Dafür wird es neben Adrenalin im Nebennierenmark gebildet, dann zu Adrenalin methyliert und in die Blutbahn abgegeben. Postganglionäre Sympathikusneurone werden von präganglionären sympathischen Neuronen cholinerg innerviert und auf diesen Reiz wird Noradrenalin auf der sympathischen Endstrecke sezerniert.

Die Synthese von Noradrenalin erfolgt über eine gemeinsame Katecholaminsynthese, die in Abb. 10 dargestellt ist. Alle Katecholamine gehören zu den biogenen oder primären Aminen, da sie durch eine Decarboxylierung einer Aminosäure (AS) entstehen, bei der die Aminogruppe erhalten bleibt.<sup>63</sup> Die Synthese beginnt bei Tyrosin, das entweder aus der essentiellen AS

Phenylalanin gebildet werden kann oder von der Nervenzelle aufgenommen wird. Die Hydroxylierung von Tyrosin wird von der Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert und es entsteht Dihydroxyphenylalanin (DOPA). Dieser Syntheseschritt ist für die Bildung aller Katecholamine gleich. Es kann in jeder katecholaminergen Zelle TH nachgewiesen werden – diese Zellen werden dann „TH-positiv“ bezeichnet. Durch eine Decarboxylierung entsteht aus DOPA Dopamin.<sup>64</sup> Über eine weitere Hydroxylierung bildet sich daraus Noradrenalin, in der Abb. 10 als Norepinephrin bezeichnet. Die Dopamin-β-Hydroxylase (DBH) katalysiert diese Reaktion und ist damit entscheidend für die Synthese von Noradrenalin. In einem letzten Schritt

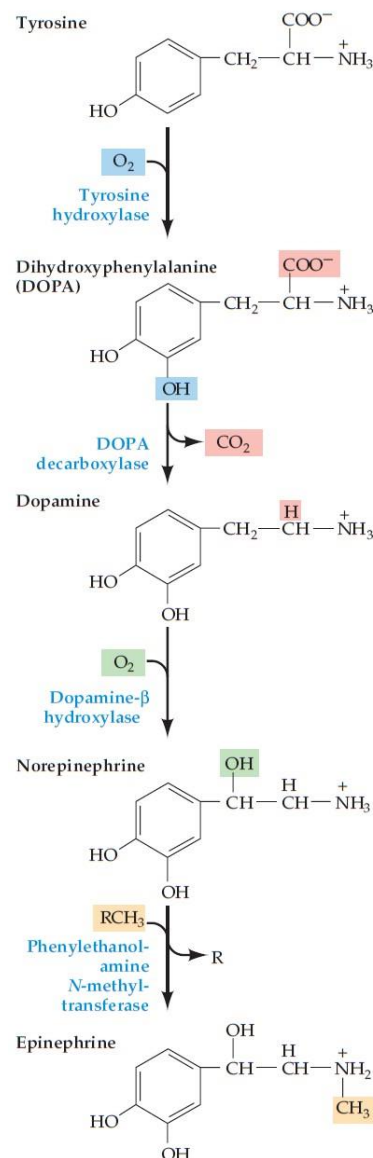


Abbildung 10: Katecholaminsynthese. Nach Purves und Williams 2004.

wird durch die Phenylethanolamin-N-methyltransferase (PNMT) das Katecholamin Adrenalin gebildet.<sup>63</sup>

Nach der Synthese wird Noradrenalin in elektronenmikroskopisch klaren Vesikeln gespeichert. Diese verschmelzen vermittelt durch Aktionspotentiale und darauf folgende intrazelluläre Steigerung der Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration mit der präsynaptischen Membran.<sup>65</sup> Noradrenalin liegt nun im synaptischen Spalt vor und bindet an Rezeptoren an der Postsynapse. Noradrenalin wird, um das Signal zu beenden, überwiegend (nahezu 90%) an der Präsynapse durch einen Noradrenalintransporter wieder aufgenommen (Reuptake).<sup>66</sup> Am Abbau von Noradrenalin sind die mitochondriale oder vesikuläre Monoamin-Oxidase und Catechol-O-Methyl-Transferase beteiligt.<sup>67</sup>

Noradrenalin bindet an  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Adrenorezeptoren. Diese können auch an der Präsynapse vorkommen und dort hemmend oder modulierend auf die Transmitterfreisetzung wirken. Adrenorezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die je nach Typ ein G-Protein der Familie Gq, Gi oder Gs binden und damit unterschiedliche Mechanismen der Signalübertragung und -wirkung haben. An den sympathisch innervierten Zielen kommen  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\beta$ -Rezeptoren vor. Je nach Rezeptor hat Noradrenalin unterschiedliche, teils sogar entgegengesetzte Wirkungen. Auf die Verteilung und die Subgruppen der Rezeptoren soll in diesem Rahmen nicht weiter eingegangen werden.<sup>68-71</sup>

Noradrenerge Systeme befinden sich zentral v. a. im Hypothalamus, der Amygdala und dem Locus coeruleus. Projektionsgebiete der relativ wenigen Noradrenalin-synthetisierenden Zellen im Gehirn umfassen trotzdem nahezu das gesamte Gehirn und Rückenmark.<sup>72</sup> Stress führt zu einer gesteigerten Transmitterfreisetzung in diesen Gebieten und in weiterer Folge zu negativen Emotionen wie Angst.<sup>73</sup> Darüber hinaus ist das noradrenerge zentrale System an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Aufmerksamkeit, der Informationsverarbeitung und an Lernprozessen beteiligt.<sup>72</sup> Zentrale Faserbahnen haben unter anderem Einfluss auf das kardiovaskuläre System, die Steuerung der Atmung und steigernde Wirkung auf das Aufmerksamkeitsniveau des Kortex.<sup>54</sup>

Peripher ist Noradrenalin der Haupttransmitter des Sympathikus und ist in sympathischen Nervenendigungen weit verbreitet. Hauptwirkungsorte von Noradrenalin sind Gefäßwände. Über eine Gefäßkontraktion in Widerstands- und Kapazitätsgefäßen kommt es zum Blutdruckanstieg. An Koronararterien führt es zur Dilatation. Die sympathische Wirkung am Herz (positiv ino-, chrono-, bathmo-, lusi-, dromotrop) und an den Bronchien (Bronchodilatation) durch Noradrenalin ist aufgrund der niedrigeren Rezeptoraffinität weitaus geringer als durch Adrenalin.<sup>74</sup> Im Fettgewebe stimuliert Noradrenalin über die Bindung an  $\beta$ -Rezeptoren die Lipolyse und die Durchblutung. Eine entgegengesetzte Wirkung wird über  $\alpha$ 2-Rezeptoren ausgelöst.<sup>75</sup> Weitere Effekte sind der Einfluss auf Immunzellen und die Thermoregulation.<sup>76</sup>

Noradrenalin ist häufig mit NPY, Somatostatin und Vasopressin kolokalisiert.<sup>54,77</sup>

Sympathische Fasernetze wurden auch im Plexus tympanicus beschrieben. Um diese genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit adrenerge Strukturen mittels eines gegen DBH gerichteten Antikörpers markiert.

### *1.1.3.2 Cholinerge Systemkomponenten*

Im Zentrum des parasympathischen Anteils des vegetativen Nervensystems steht der Neurotransmitter Acetylcholin, welcher sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem vorkommt. Acetylcholin ist der Transmitter aller präganglionären Neurone im ANS, der postganglionären parasympathischen Nervenendigungen und auch derjenigen postganglionären sympathischen Nervenendigungen, die Schweißdrüsen versorgen.<sup>78,56</sup>

Das von Loewi erstmals 1921 als „Vagusstoff“ bezeichnete Acetylcholin wird aus Cholin und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) hergestellt.<sup>50,79</sup>

Acetylcholin wird über einen Antiporter (Vesikulärer Acetylcholin-Transporter, VAChT) in neurosekretorische Vesikel transportiert, in denen zwischen 5000 bis 10000 Acetylcholinmoleküle enthalten sind. Diese Speichervesikel liegen in



hoher Anzahl an den Synapsen vor (ca. eine Million bei der synaptischen Endplatte) und nach Eintreffen eines Aktionspotentials gelangt Acetylcholin über Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt.<sup>80</sup> Freigesetztes Acetylcholin bindet an Acetylcholinrezeptoren an der Postsynapse.<sup>81</sup> Über die Bindung an Rezeptoren an der Präsynapse kann die Freisetzung des Transmitters kontrolliert werden. Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), welches in der prä- und postsynaptischen Membran verankert ist, sich aber nach Sekretion auch im synaptischen Spalt befinden kann, spaltet Acetylcholin in Cholin und Acetat. Durch die hohe Aktivität der AChE kommt es schon bei niedriger AcetylcholinKonzentration zu einer schnellen Hydrolyse, wodurch eine Ausbreitung von Acetylcholin ausbleibt. Die Wirkung auf andere Organe durch eine parakrine Übertragung wird dadurch verhindert.<sup>82</sup> Erst bei hoher ACh-Konzentration im synaptischen Spalt erfolgt eine Hydrolyse durch das unspezifische Enzym Butyrylcholinesterase (BuChE, auch Pseudocholinesterase). Cholin wird über einen Natrium-Cholin-Symporter (CHT1) an der Präsynapse wieder aufgenommen und steht somit erneut für die Synthese von Acetylcholin bereit.<sup>83</sup> Die Wiederaufnahme von Cholin ist essentiell für die Synthese von Acetylcholin, da die Nervenzelle Cholin nicht selbst herstellen kann. Die Wiederaufnahme ist damit der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Acetylcholinsynthese.<sup>84,85</sup> Acetyl-CoA wird über mehrere Schritte und Umwandlungen in Citrat, welches die Mitochondrienmembran passieren kann, aus Pyruvat hergestellt.

Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der Synthese, der Freisetzung und des Abbaus von Acetylcholin an einer Synapse.

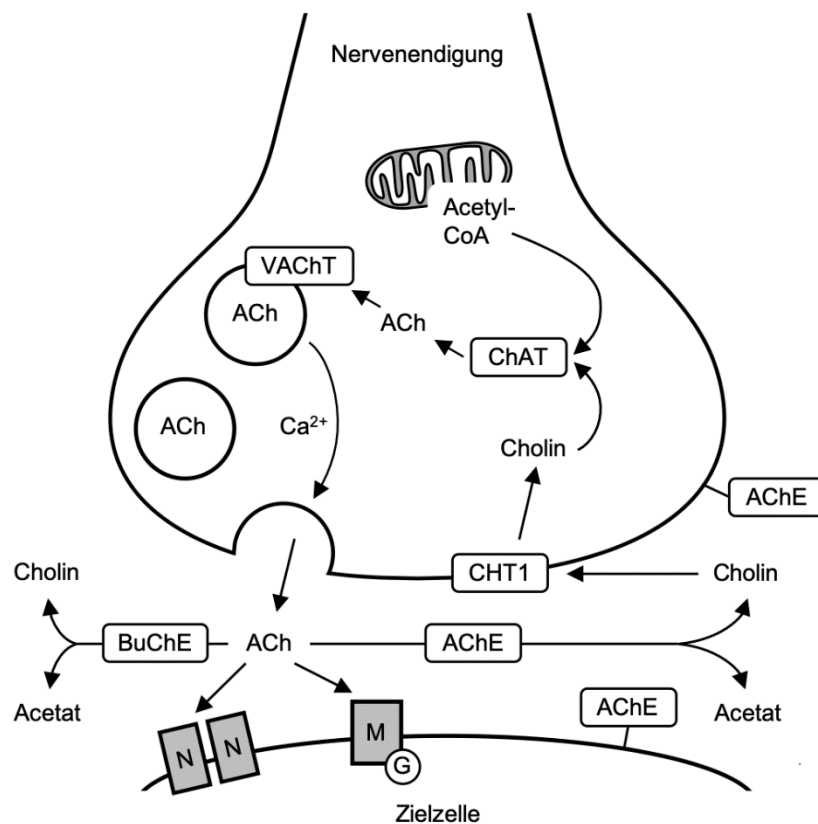


Abbildung 11: Übersicht über Synthese, Freisetzung und Recycling von Acetylcholin. Modifiziert nach Kummer 2008.

ACh: Acetylcholin, AChE: Acetylcholinesterase, BuChE: Butyrylcholinesterase, ChAT: Cholin-acetyltransferase, CHT1: Natrium-Cholin-Sympporter, G: G-Protein, N: nikotinischer Acetylcholinrezeptor, M: muskarinischer Acetylcholinrezeptor, VAcHT: vesikulärer Acetylcholin-Transporter.

Es gibt zwei Rezeptoren, an die Acetylcholin bindet und die sich funktionell, strukturell und in ihrer Art der Signaltransduktion unterscheiden: ionotrope nikotinerge und metabotrope muskarinerge Rezeptoren. Die beiden Rezeptoren wurden jeweils nach ihrem typischen selektiven Agonisten Nikotin oder Muskarin bezeichnet.

Die Bindung erfolgt an allen Synapsen der postganglionären Neurone an einen nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR), also einen ligandengesteuerten Ionenkanal, wodurch es zur Kanalöffnung und zum Einstrom von Natrium (Na<sup>+</sup>)

und einer Depolarisation kommt. Dies geschieht im Millisekundenbereich und wird schnelle synaptische Transmission genannt.<sup>86</sup> Der nAChR ist ein Ionenkanal, der aus fünf membrandurchspannenden Untereinheiten besteht. Bisher sind 17 Untereinheiten bekannt, die in unterschiedlichen Kombinationen eine Vielzahl von verschiedenen nAChR bilden können, die im ZNS und PNS vorkommen.<sup>87</sup> Die Aktivierung des nAChR, d. h. seine Öffnung, wird durch die Bindung von zwei Acetylcholinmolekülen aktiviert.<sup>88</sup>

An den restlichen peripheren Synapsen erfolgt die Übertragung über muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) zu den vegetativen Zielzellen. Durch eine Acetylcholinbindung an den Rezeptor werden über intrazellulär gekoppelte G-Proteine second-messenger Systeme aktiviert und damit zelluläre Prozesse beeinflusst.<sup>89</sup> Im Vergleich zu der Transmission an nAChR wird hier von einer verzögerten Signalübertragung oder Neuromodulation gesprochen. Die Entstehung einer postsynaptischen Antwort geschieht hier im Sekundenbereich.<sup>86</sup> Der mAChR ist ein heptahelikaler Rezeptor, der aus sieben transmembranären Helixstrukturen besteht, die über je drei intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden werden. Es sind fünf verschiedene Subtypen bekannt (M1-5), welche über verschiedene G-Proteine Signale ins Innere der Zelle weiterleiten.<sup>89</sup>

Neben der neuronalen cholinergen Transmission gibt es ein noch weniger bekanntes nicht-neuronales cholinerges System, welches jedoch weit verbreitet und evolutionsgeschichtlich viel älter ist. Acetylcholin kommt nämlich beispielsweise auch in Epithelien oder Zellen der Immunabwehr vor.<sup>78</sup> Nicht-neuronales Acetylcholin dient als auto- oder parakrin wirkender Zytotransmitter, der regulierend auf viele Zellfunktionen wie z. B. Proliferation, Apoptose und Sekretion wirkt.<sup>90</sup> Dieser Mechanismus ist ähnlich der parasymphatischen Endstrecke an der glatten Muskulatur und der Drüsenzelle.

## 1.2 Potentiell im Plexus tympanicus vorkommende Neuropeptid- und Neurotransmittersysteme

Ernst und Berta Scharrer entdeckten im Jahr 1928 sekretorische Nervenzellen in unterschiedlichen Stämmen des Tierreichs und begründeten damit die neue Disziplin der Neuroendokrinologie.<sup>91</sup> Fundamental war die Erkenntnis, dass Neurone sowohl neuronale als auch glanduläre Eigenschaften haben können. Insbesondere widmeten sich diese Autoren dann der intensiven Erforschung des hypothalamo-neurohypophysären Systems als einer neurosekretorischen Bahn und übergeordneten Kontrollinstanz der peripheren Hormonsysteme.<sup>92</sup> Neuropeptide sind modulierende Faktoren: gemeinsam mit den Transmittersystemen dienen sie der interneuronalen Kommunikation. Bisher ist keine direkte Reaktion wie z. B. das Öffnen eines Ionenkanals an der Zielzelle bekannt, die eigenständig von Neuropeptiden ausgelöst wird. Sie verändern also nicht die Spannung an der postsynaptischen Membran im Sinne von Aktionspotentialen, wie es von Neurotransmittern bekannt ist, sondern wirken durch ihre Bindung an Rezeptoren auf Zellfunktionen der postsynaptischen Zelle. Beispielsweise können sie eine Wachstumsstimulation oder die Induktion von langfristigen Veränderungen am Effektorneuron bewirken. Dabei konnten sowohl hemmende und stimulierende Signale als auch Feedbackschleifen nachgewiesen werden.

Neurosekretorische Neurone des hypothalamo-hypophysären Systems schütten Neuropeptide aus, die über den Blutkreislauf an Rezeptoren auf weiter entfernten Zielzellen wirken können. Dies wird als neurohumerales System bezeichnet. Die bewirkten Effekte von Neuropeptiden treten langsamer ein, sind dafür aber länger anhaltend.

Vielfältige Untersuchungen, darunter besonders elektronenmikroskopische Studien, konnten beweisen, dass es einen weiteren Übertragungsweg gibt: es wurden synapsenähnliche („synaptoid“) Endigungen an Nervenzellen gefunden, die mit Peptiden gefüllte sekretorische („dense core“-) Granula enthalten. Diese eher parakrin wirksamen Peptide stellen die neuropeptiderge Kommunikation in unmittelbarer Umgebung des synaptoiden Abgabeortes dar.

Hierbei wird von peptiderger Innervation gesprochen, die auch reziprok zwischen peptidergen Neuronen stattfinden kann.<sup>93</sup>

Neuropeptide sind mit ihrer regulierenden Funktion wichtige Neuromodulatoren und durch die Forschung in den vergangenen Jahrzehnten hat ihre Bedeutung rapide zugenommen, sodass bis dato über 100 Neuropeptide bekannt sind. Die Vielzahl an neu entdeckten Neuropeptiden lässt sich in Familien einordnen, die sich in ihrer chemischen Struktur ähneln. Forschungen über die Synthese von Neuropeptiden, Transport- oder Sekretionsmechanismen werden durch Untersuchungen ergänzt, bei denen Vorkommen und Verteilung von neurosekretorischen Zellen - neben dem Hypothalamus - im zentralen und peripheren Nervensystem beschrieben werden.<sup>94</sup>

Allgemein sind Neuropeptide große Moleküle, deren Wirkung langsam einsetzt, aber relativ lange anhält. Die Konzentration von Neuropeptiden ist niedriger als von Neurotransmittern, deren Molekülgröße geringer ist und deren exzitatorische oder inhibitorische Wirkung schnell einsetzt und (abgesehen von der *long term potentiation*) auch nur kürzere Zeit anhält.

Die Synthese von Neuropeptiden erfolgt meist über inaktive Vorstufen, die oft über 90 Aminosäuren lang sind. Der sog. Precursor Proopiomelanocortin ist beispielsweise in unterschiedlichen Geweben ein Vorläufer für verschiedene biologisch aktive Peptide. Dabei spielen Endo- und Exopeptidasen und posttranslationale Modifikationen wie z. B. Acetylierungen oder Phosphorylierungen eine Rolle. Der Syntheseort ist das raue endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat. Der Transport von Neuropeptiden innerhalb der Nervenzelle erfolgt in großen synaptischen Vesikeln mit dichterem Kernbereich, sog. *large dense-core vesicles*. Die Transportgeschwindigkeit zwischen Perikaryon und Abgabeort ist mit wenigen Zentimetern pro Tag sehr gering.<sup>94</sup> Elektronenmikroskopisch ausgewertete Studien über magnozellige Neurone des Hypothalamus konnten zeigen, dass peptiderge Neurone ihre mit Neuropeptiden gefüllten Granula über Exozytose sowohl aus dem Zellkörper als auch aus Axonendigungen, Dendriten und anderen Teilen des Neurons ausschütten können.<sup>95</sup> Die Konzentration der Neuropeptide ist in den Axonendigungen jedoch weitaus höher als in den anderen Teilen der

Nervenzelle. Ausschlaggebend für die Ausschüttung ist ein Calciumstimulus, wie er auch von anderen sekretorischen Geweben bekannt ist.<sup>96</sup> Jedoch erfolgt die Exozytose im Vergleich zu Neurotransmittern, die in großer Zahl in kleinen synaptischen Vesikeln nahe am Ort des Calciumeinstroms in den axonalen Endigungen liegen, bei wesentlich niedrigeren cytosolischen Calciumkonzentrationen und meist zusammen mit anderen Neurotransmittern. Obwohl die Ausschüttung von Neuropeptiden teilweise sehr diffus ist, kommt es nur an bestimmten Zielstrukturen, die einen entsprechenden Rezeptor besitzen, zu einer Reaktion.

Die Abb. 12 stellt die Biosynthese, die weitere Verarbeitung, den Transport und die Freisetzung von Neuropeptiden in sehr vereinfachter Form dar.

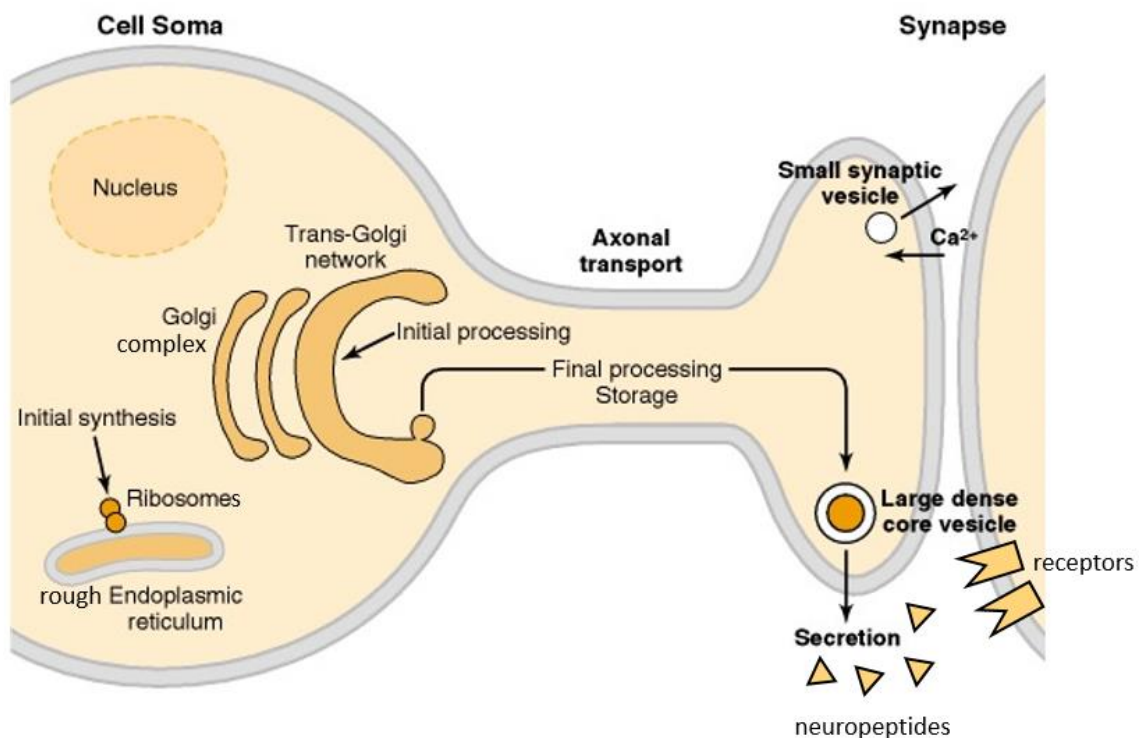


Abbildung 12: Überblick über die Biosynthese von Neuropeptiden bis zu ihrer Sekretion. Modifiziert nach Mains 1999.

Im Gegensatz zu dem bekannten Reuptake und der Wiederverwendung von Neurotransmittern in den axonalen Endigungen, werden die Neuropeptide der

*large dense-core vesicles* nach Abgabe von Peptidasen im „synaptischen“ (parakrinen) Spalt zerstört, die Aminosäuren an der Präsynapse reinternalisiert und nach dem Transport zum Zellkörper wiederverwendet. Weder die Vorläufer von Neuropeptiden noch die Neuropeptide selbst werden als Gesamtmolekül wiederverwendet.<sup>94</sup>

Ebenfalls kann man nicht verallgemeinern, dass ein Neuropeptid nur eine einzige Funktion hat. Je nach Rezeptor der Zielzelle kommt es zu unterschiedlichen Reaktionen.<sup>96</sup> So vermittelt SP z. B. die Schmerztransmission in primär afferenten Neuronen, hat aber noch weitere Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem.

Mittels Immunocytochemie konnte das Nebeneinandervorkommen von Neurotransmittern und -peptiden nachgewiesen werden. Dabei gibt es je nach Lokalisation im zentralen oder peripheren Nervensystem Kombinationen wie z. B. Serotonin mit SP oder Acetylcholin mit VIP.<sup>97</sup> Die Dimension und Bedeutung der Koexistenz von Neurotransmittern und Neuropeptiden und deren Interaktionen ist jedoch nur ansatzweise erforscht. Gerade im peripheren vegetativen System ist das Zusammenwirken von Peptiden und Transmittern noch sehr lückenhaft. Insbesondere fehlen aufschlussreiche Analysen zum Vorkommen und zum Wirkungsgefüge von übergeordneten vegetativ nervösen Organplexus und den prävertebralen Plexus; solchen Plexus muss letztendlich auch der im Zentrum dieser Arbeit stehende Plexus tympanicus zugeordnet werden.

### 1.2.1 Vasoaktives intestinales Peptid

#### *Entdeckung und Strukturformel*

Said und Mutt<sup>98-100</sup> konnten das Vasoaktive intestinale Peptid (VIP) als Octacosapeptid aus dem oberen Gastrointestinaltrakt (GIT) des Schweins isolieren und dessen Aminosäuresequenz 1974 entschlüsseln.

**His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub>**

*Abbildung 13: Aminosäuresequenz von VIP, isoliert aus dem Gastrointestinaltrakt des Rindes.*

Unter den Säugetieren hat VIP eine ausgesprochen konstante Struktur. Die Aminosäuresequenz ist beim Menschen, Schwein, Rind und der Ratte identisch.<sup>101,102</sup> Beim Huhn und beim Meerschweinchen unterscheidet sich die Sequenz jeweils in vier Aminosäuren.<sup>103,104</sup>

#### *Zugehörigkeit zur Sekretin-Glukagon-Gruppe*

Strukturell ähnelt VIP fünf anderen Peptiden: Sekretin, „*Peptide Having Carboxy-terminal Methionine/Isoleucine*“, „*gastric inhibitory polypeptide*“, „*Growth hormone-releasing factor*“ und Glukagon.<sup>99,105</sup> Keines der zugehörigen Peptide besitzt Disulfidbrücken oder die AS Cystein. Diese Familie wird auch Sekretin-Glukagon-Gruppe genannt.<sup>106</sup> Funktionell wurden VIP schon bei seiner Entdeckung Eigenschaften von Sekretin und Glukagon zugeschrieben.<sup>98</sup>

#### *Vorkommen und Funktion*

VIP wird peripher v. a. gemeinsam mit Acetylcholin in parasymphatischen Nervenfasern gefunden.<sup>107</sup> Deren Verlauf um Gefäße wird als spiralförmig beschrieben.<sup>108</sup>

Das vasoaktive Peptid konnte in der Adventitia und Tunica media von Arterien und in der Muskelschicht von großen, dickwandigen Venen nachgewiesen



werden.<sup>109</sup> Seine vasodilatatorische Wirkung führt zu einem erhöhtem Blutfluss und einer höheren Permeabilität der Gefäße. VIP wird auch in Zusammenhang mit dem Anschwellen der Nasenschleimhaut gebracht.<sup>110</sup>

Die Dichte von VIP-haltigen Nervenfasern in der Nähe von submukösen Drüsen ist hoch, sodass ein Einfluss auf die Sekretion exokriner Drüsen angenommen wird.<sup>111</sup> Lundberg et al.<sup>53</sup> konnten mit Hilfe von immunocytochemischen Methoden VIP und Acetylcholinesterase in den gleichen Neuronen im Drüsengewebe von exokrinen Drüsen der Katze nachweisen und unterstützen damit die Annahme der Koexistenz von VIP und Acetylcholin. Dabei wurden große *dense-core vesicles* beschrieben.

VIP wurde erstmals aus dem GIT isoliert und mittels Immunocytochemie konnten dort dichte Netzwerke von VIP-immunreaktiven Nervenfasern nachgewiesen werden; v. a. in der Lamina propria, im Plexus submucosus und in der glatten Muskulatur.<sup>107</sup> VIP bewirkt eine Relaxation im Magen und in den nachfolgenden Anteilen des GIT.<sup>112,113</sup>

Im enterischen System stimuliert VIP die Freisetzung von Insulin und Glucagon, hemmt die Gastrinsekretion und stimuliert die Lipolyse und Glykogenolyse.<sup>55,114,115</sup>

Auch im ZNS ist VIP weit verbreitet: v. a. im Kortex, Hippocampus, Ncl. suprachiasmaticus, in der Amygdala und im Hirnstamm.<sup>116,117</sup> In niedrigerer Konzentration konnte VIP in den Basalganglien, im Kleinhirn und Rückenmark nachgewiesen werden.<sup>118</sup>

Im Portalkreislauf der Hypophyse konnten hohe Konzentrationen von VIP bestimmt werden, sodass ein Einfluss auf die Freisetzung von Hypophysenhormonen nahe liegt. Es konnte eine Stimulation der Freisetzung von Prolaktin<sup>119</sup> und *Growth Hormone*<sup>120</sup>, sowie eine modulierende Wirkung auf die Freisetzung von Luteinisierendem Hormon (LH) gezeigt werden.<sup>121</sup> Eine weitere Rolle spielt VIP in der Regulation der Freisetzung von Oxytocin und Vasopressin (auch Antidiuretisches Hormon) aus der Neurohypophyse.<sup>122</sup>

Außerdem hat VIP eine bronchodilatatorische Wirkung<sup>123</sup>, es wirkt antiinflammatorisch<sup>124</sup>, hemmt die Freisetzung von Mediatoren wie

beispielsweise Interleukin (IL) -6, IL-12 und Tumornekrosefaktor  $\alpha^{125}$  und hat einen möglichen Einfluss auf den Tag-Nacht-Zyklus<sup>126</sup>. VIP findet sich auch im Urogenitaltrakt und spielt eine Rolle bei der penilen Erektion.<sup>112</sup>

Im Plexus tympanicus, für den Untersuchungen zum Vorkommen von Neuropeptiden weitgehend fehlen, ist ein Vorkommen von VIP bisher nicht beschrieben worden.

### 1.2.2 Neuropeptid Y

#### *Entdeckung und Strukturformel*

Tatemoto gelang es 1982 das Neuropeptid Y (NPY) aus Schweinegehirnen zu isolieren und die Sequenz des Polypeptids zu entschlüsseln.<sup>127</sup> NPY besteht aus 36 Aminosäuren und hat einen Tyrosinamidrest sowohl am NH<sub>2</sub>-terminalen als auch am COOH-terminalen Ende.<sup>128</sup> Y steht für die AS Tyrosin und ist damit namensgebend für NPY, welches auch „*neuropeptide tyrosine*“ genannt wird.<sup>129</sup>

**Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-  
Pro-Ala-Glu-Asp-Met-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-  
Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>**

*Abbildung 14: Aminosäuresequenz von NPY, isoliert aus dem Rattenhirn.*

Auffällig ist die geringe Varianz der Primärstruktur von NPY selbst bei entwicklungsgeschichtlich weit vom Menschen entfernten Spezies. Die Aminosäuresequenz ist beim Menschen, Kaninchen und Meerschweinchen identisch und unterscheidet sich lediglich in einem Aminosäurerest von der Sequenz der Ratte. Auch Huhn und Goldfisch unterscheiden sich nur in einem Aminosäurerest bzw. fünf Aminosäureresten von der menschlichen NPY-Sequenz.<sup>130</sup> Aufgrund dieser phylogenetischen Konstanz lässt sich vermuten, dass NPY eine Rolle in basalen, entwicklungsgeschichtlich alten Regelkreisen spielen muss, wie man sie im vegetativen Nervensystem vermutet.

### *Die Neuropeptid Y-Peptidfamilie*

NPY gehört mit dem Peptid YY (PYY) und dem Pankreatischen Polypeptid (PP) zur Gruppe der pankreatischen Polypeptide.<sup>131,132</sup> Nahezu alle diese Peptide besitzen eine Aminosäuresequenz von 36 AS, bisher wurden nur zwei Ausnahmen bei PYY gefunden. 24 von 36 AS von menschlichem NPY und PYY sind vollkommen identisch, bei PP entsprechen 18 AS denen von NPY.<sup>129</sup> Die strukturelle Homologie von menschlichem NPY stimmt also zu 67% mit PYY und zu 50% mit PP überein.

### *Vorkommen und Funktion*

NPY ist nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern auch im peripheren Nervensystem weit verbreitet und hat vielfältige Wirkungen, die über verschiedene Rezeptorsubtypen vermittelt werden.<sup>133</sup>

Encephales NPY spielt eine Rolle in der zentralen Regulation von Appetit, Angst, metabolischen Prozessen und in der Reproduktion. Dabei hat NPY einen Effekt auf die LH-Freisetzung.<sup>134</sup> Gruaz und Mitarbeiter<sup>135</sup> fanden heraus, dass es zu unterschiedlichen, teilweise gegensätzlichen Wirkungen kommen kann: eine kurze intrazerebrale Gabe wirkt bei kastrierten Ratten sexuell inhibierend, die dauerhafte Verabreichung hemmt die somatotrope und gonadotrope Achse, während NPY in der Proöstrusphase, der ersten von vier Phasen im Sexualzyklus, stimulierende Wirkung hat.<sup>135</sup> NPY wirkt außerdem orexigen: es steigert bei Ratten dosisabhängig die Nahrungsaufnahme, führt zur Insulinsekretion und vermindert den Energieverbrauch.<sup>136,137</sup> Eine chronisch erhöhte zentrale NPY-Aktivität führt zu Fettleibigkeit.<sup>136</sup> Des Weiteren spielt NPY eine Rolle in der Steuerung des zirkadianen Rhythmus und der Thermoregulation.<sup>138,139</sup>

Die peripheren Funktionen lassen sich auf die vasokonstriktorische Wirkung und den Gefäßtonus, die Kreislaufregulation und Beeinflussung der Motilität im GIT erweitern. Generell gibt es stimulierende, aber auch inhibitorische Einflüsse auf sympathische Funktionen.<sup>140</sup>

Bei der Ratte ist NPY im zentralen Nervensystem weit verbreitet. Besonders hohe Konzentrationen wurden in zahlreichen Kernen des Hypothalamus gefunden (z. B. in der Eminentia mediana). Niedrigere Konzentrationen ließen sich im Cortex nachweisen.<sup>141</sup> Auch beim Menschen kommt NPY im peripheren Nervensystem sowie in sehr vielen Hirnarealen vor, in besonders hoher Konzentration im Hypothalamus und im limbischen System.<sup>142,143</sup>

Lundberg konnte NPY im peripheren Nervensystem der Muskulatur von Blutgefäßen und zahlreichen Organen (z. B. Herzohr oder Plexus des Vas deferens der Ratte) nachweisen. Außerdem war es im submukösen Plexus des Dünndarms und in einigen Ganglienzellen lokalisiert. NPY konnte v. a. in Koexistenz mit Noradrenalin in sympathischen Neuronen gefunden werden.<sup>140</sup>

Detaillierte Analysen über das Vorkommen von NPY im Plexus tympanicus und im umliegenden Ohrbereich fehlen bislang.

### 1.2.3 Substanz P

#### *Entdeckung und Strukturformel*

Das Neuropeptid Substanz P (SP) konnte erstmals 1970 von Chang isoliert werden, nachdem Euler und Gaddum eine biochemisch noch unbekannt Peptidfraktion bereits 1931 als vasodilatatorisch wirkenden Stoff beschrieben haben.<sup>144,145</sup> Das Peptid wurde zuerst *preparation P*, später erst *substance P* benannt.<sup>146</sup> Der namensgebende Buchstabe P kommt vom englischen Wort *powder* und beschreibt lediglich den Zustand, in dem die Substanz zuerst vorlag.<sup>147</sup> Heute wird SP v. a. mit seinen Effekten in der Schmerztransmission und bei Inflammationsprozessen in Verbindung gebracht, wodurch der Buchstabe P eher als Abkürzung von *pain*, dem englischen Wort für Schmerz, angesehen wird.

1971 gelang es Chang und Leeman<sup>147</sup> die Aminosäuresequenz aus elf Aminosäuren von SP aus dem Hypothalamus vom Rind zu entschlüsseln.

**Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>**

*Abbildung 15: Aminosäuresequenz von SP, isoliert aus bovinem Hypothalamusgewebe.*

### *Zugehörigkeit zur Tachykininfamilie*

SP gehört zur Familie der Tachykinine. Die bekanntesten Vertreter bei Wirbeltieren sind Neurokinin A (NKA = Neurokinin  $\alpha$  oder Substanz K) und Neurokinin B (NKB = Neurokinin  $\beta$  oder Neuromedin K), wobei im Tierreich inzwischen über 40 Tachykinine entdeckt wurden.<sup>96,148</sup> Schon der Name (aus dem griechischen *tachýs* – schnell) gibt einen Hinweis auf ihre Fähigkeit, die schnelle Kontraktion glatter Muskulatur hervorzurufen. Tachykinine bestehen meist aus acht bis zwölf Aminosäuren, wobei man die Familienzugehörigkeit an einer häufig vorkommenden identischen Aminosäuresequenz erkennt. Bei einem Großteil der Tachykinine findet sich: -Phe-(Phe, Tyr, Val, Ile)-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.<sup>149</sup> SP, NKA und NKB werden durch die drei Gene Tac1, Tac3 und Tac4 kodiert und über mehrere Vorstufen und alternatives Spleißen synthetisiert.<sup>146</sup>

### *Vorkommen und Funktion*

Alle Tachykinine binden an vier (bisher bekannte) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Neurokinin-1 Rezeptor = NK-1R, NK-2R, NK-3R und NK-4R), wobei unterschiedliche Tachykinine an den gleichen Rezeptortyp binden können. SP hat hierbei am NK1-Rezeptor eine 100 - 500-fach höhere Affinität als NKA oder NKB<sup>150</sup>, am NK2-Rezeptor hingegen eine niedrigere Affinität als NKA.<sup>151</sup>

In immuncytochemischen Untersuchungen konnte eine weite Verteilung von SP im Gehirn nachgewiesen werden, v. a. in den Basalganglien und im Hirnstamm.<sup>152</sup> Weitere Lokalisationen konnten in sensiblen Ganglien, in absteigenden Bahnen im Rückenmark, in peripheren unmyelinisierten afferenten Fasern (C und A- $\delta$ -Fasern), in Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts und in

Organen des Lymphsystems und Leukozyten gefunden werden.<sup>153-155</sup> Die weit verbreitete SP kann in Nervenfasern nachgewiesen werden, die in der Nähe von Blutgefäßen oder sekretorischen Zellen verlaufen.<sup>156</sup> Insbesondere wird SP periazinär und um große Drüsengänge in den Speicheldrüsen gefunden.<sup>108</sup>

Funktionell wird SP heute v. a. mit Schmerz in Verbindung gebracht. Dabei wurden sowohl eine analgetische als auch eine hyperalgetische Wirkung beobachtet. Je nach Schmerzempfindlichkeit war SP also in der Lage die Schmerzschwelle entweder zu erhöhen oder zu senken. Eine hyperalgetische Wirkung hat SP auf Mäuse gezeigt, die eher schmerzempfindlich waren. Bei besonders schmerzempfindlichen Zuchtstämmen zeigte sich eine analgetisierende Wirkung. Bei einer dritten Gruppe mit Mäusen mit mittlerer Schmerzempfindlichkeit war SP praktisch wirkungslos. Das Peptid erreicht also mit einer Modulation eine Normalisierung der Schmerzschwelle. Hecht und Oehme prägten für diese Stoffklasse aufgrund dieses Modulatoreffekts den Begriff *Regulide* von **regulatory peptide**.<sup>157</sup>

Wie schon 1931 von Euler beobachtet hat SP eine vasodilatatorische Wirkung. Über eine Modulierung der Herzfrequenz, des Blutflusses und des Blutdrucks hat SP noch weitere Effekte auf das kardiovaskuläre System. Je nach Ausgangszustand können auch hier vasodilatatorische oder vasokonstriktive Effekte überwiegen. Die Wirkung wird sowohl direkt in der Körperperipherie als auch indirekt durch zentrale Schaltkreise vermittelt.<sup>158</sup>

Vor allem über die Freisetzung von SP aus peripheren Nerven und das Binden an den NK-1R, der von vielen Immunzellen exprimiert wird, kommt es zu einer proinflammatorischen Reaktion. SP wirkt stimulierend auf die Zytokinproduktion und die Proliferation von Immunzellen.<sup>159</sup> Leukozyten können auch selbst SP bilden. SP-immunreaktive Nervenfasern konnten im Thymus, im Knochenmark, in der Milz und in weiteren sekundären lymphatischen Organen gefunden werden.<sup>160,161</sup> Es steht auch hier v. a. die immunmodulatorische Funktion vom SP im Vordergrund.<sup>162</sup>

SP kommt in enterischen Neuronen vor und kann direkt auf die Muskulatur wirken oder indirekt durch Stimulation von Neuronen des Plexus myentericus.<sup>163</sup> Außerdem beeinflusst SP die Speichel- und Pankreassaftsekretion. SP kann im

gastrointestinalen System sowohl aktivierend als auch hemmend wirken und fungiert damit als Modulator.<sup>164,165</sup>

Schon früh wurde der Einfluss von SP auf das aminerge System und damit auf Stressreaktionen diskutiert.<sup>166</sup> Es konnte ein Antistress-Effekt beobachtet werden: In Experimenten wurden Ratten unter Stress (z. B. Lärm, Elektroschocks) gesetzt, sie entwickelten darunter stressbedingte vegetative und neuronale Störungen und stressbedingte Hypertonie. Diese Effekte fielen geringer aus, wenn eine Stunde vor Einsetzen des Stresses SP gegeben wurde.<sup>167</sup> Weitere Studien an der Nebenniere stützen diese Ergebnisse: SP hemmt einerseits die cholinerg induzierte Freisetzung von Katecholaminen<sup>168</sup> und wirkt andererseits einer nikotininduzierten Desensibilisierung der Freisetzung von Katecholaminen entgegen.<sup>169,170</sup> SP besitzt also allgemein eine modulierende Wirkung in der Entstehung und Bewältigung von Stresssituationen.<sup>167,171</sup>

Von 1983 bis 1991 wurden Studien durchgeführt, in denen gezeigt wurde, dass ein Zusammenhang zwischen SP und der essentiellen Hypertonie existiert. Dabei wurden signifikant niedrigere SP-Spiegel im Plasma von Patienten mit Hypertonie gemessen als in der Vergleichsgruppe mit normotensiven Personen. Unter der Behandlung mit Antihypertensiva stiegen die SP-Plasmaspiegel wieder an.<sup>172,173</sup> Ähnliche Effekte wurden auch in einer Untersuchung an Ratten beobachtet.<sup>174</sup> SP könnte also in der Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie eine Rolle spielen und eventuell auch im Rahmen neuer Therapieansätze in Frage kommen. Dieser Ansatz wurde jedoch nicht weiterverfolgt.

Zusätzlich spielt SP eine Rolle beim Erbrechen, bei respiratorischen, neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen.<sup>175</sup>

Kurz zusammengefasst fungiert SP als Modulator in sehr vielen Kontrollsystemen und dient einer ausgeglichenen Homöostase. In den Studien konnte trotz der nur kurzen Halbwertszeit von SP eine viel länger andauernde Wirkung beobachtet werden, was ebenfalls die Annahme unterstützt, dass SP eine modulierende Funktion hat.

Auch für SP liegen keine Befunde zum Vorkommen im Plexus tympanicus vor, obwohl es aufgrund seiner modulatorischen Effekte ein geeigneter Kandidat auch in diesem vegetativen Nervengeflecht ist.

#### 1.2.4 Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase

In Kapitel 1.1.3.1 wurde bereits auf die adrenerge Systemkomponente des vegetativen Nervensystems eingegangen. Ergänzend soll nun erklärt werden, dass der immunocytochemische Nachweis für noradrenerge und adrenerge Neurone mittels Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase möglich ist.<sup>176</sup> Dieses Enzym katalysiert die Hydroxylierung von Dopamin zu Noradrenalin und damit den letzten Schritt in der Noradrenalinsynthese.

Es gibt eine Vielzahl von Studien, die sich mit verschiedenen Nachweismethoden des katecholaminergen Systems beschäftigen. Die dabei verwendeten Antikörper sind gegen TH, DBH oder PNMT gerichtet.<sup>177</sup> Die Enzyme stellen jeweils verschiedene Stufen der Katecholaminsynthese dar (s. Abb. 10). Beispielsweise ist TH ein gemeinsames Enzym in der Synthese von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin und kann daher Neurone nachweisen, die eines der drei Katecholamine bilden. Relativ unspezifisch werden mit diesem AK also auch dopaminerge oder adrenerge Strukturen markiert.<sup>178</sup>

In Immunfluoreszenzstudien konnten spezifisch DBH-markierte Zellen peripher im Nebennierenmark, sympathischen Ganglien, gefäßbegleitend um Koronararterien, Gefäße in der Wand des Ileum und im arteriellen Gefäßsystem der Niere v. a. nah am Glomerulum nachgewiesen werden.<sup>179</sup> Im GIT des Meerschweinchens wurden DBH-immunreaktive Fasern in der zirkulären Muskelschicht gefunden.<sup>180</sup>

Im ZNS wurde DBH in der Medulla oblongata und dem Pons gefunden.<sup>177,179</sup> Der Locus coeruleus weist eine besonders hohe Anzahl DBH-positiver Neurone auf. Im Gehirn wurde außerdem beobachtet, dass v. a. kleine Gefäße im Vergleich zu den Größeren von einem dichten DBH-immunreaktiven Netz von Nervenfasern begleitet werden.<sup>181</sup>



### 1.2.5 Cholin-Acetyl-Transferase

In Ergänzung zu Kapitel 1.1.3.2 soll in diesem Unterpunkt auf den Nachweis von Acetylcholin als Transmitter im parasympathischen vegetativen Nervensystem eingegangen werden. Obwohl Acetylcholin zu den schon früh entdeckten Transmittern gehört, fehlte lange Zeit eine geeignete Methode, um cholinerge Neurone nachzuweisen.<sup>182</sup> Im Fokus der Forschung einer geeigneten Nachweismethode standen folgende Proteine: die Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACHT) und die Acetylcholinesterase.

Eine Methode, auf die nicht näher eingegangen wird, ist der Nachweis über Antikörper, die gegen das carboxyterminale Ende des VACHT gerichtet sind und damit auch cholinerge Neurone detektieren.<sup>183</sup>

Koelle und Friedenwald entwickelten eine Methode, mit der cholinerge Neurone über einen Aktivitätsnachweis von Cholinesterasen lokalisiert werden sollten.<sup>184,185</sup> Es stellte sich jedoch heraus, dass mit dieser Methode in einigen Neuronen eine hohe Enzymaktivität nachgewiesen wurde, welche sicher nicht cholinerg waren.<sup>186</sup> Acetylcholinesterase kommt auch in postsynaptischen nicht-cholinergen Zellen, monoaminergen Neuronen und nicht-neuronalen Strukturen vor und stellt damit keinen spezifischen Marker für cholinerge Neurone dar.<sup>182,187,188</sup> Nachdem an dieser Methode Zweifel hinsichtlich ihrer Spezifität aufkamen, etablierte sich ein immunocytochemisches Verfahren, mit dem cholinerge Neurone über einen gegen ChAT gerichteten Antikörper lokalisiert werden.<sup>189</sup> Dieses Enzym kommt cytosolisch und membrangebunden vor, katalysiert die Bildung von Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA und färbt demnach Zellen an, die Acetylcholin synthetisieren. McGeer fasst in einem Minireview ausführlich zusammen wie schwer sich die Gewinnung von Antikörpern gegen ChAT gestaltete.<sup>190,191</sup> Aufgrund der Instabilität des Enzyms und seiner geringen Konzentration in den meisten Geweben war schon die Isolierung von ChAT schwierig.<sup>192,193</sup> Die Antigenität von ChAT ist nicht besonders hoch, was die Bildung von Antikörpern, die gegen das Enzym gerichtet sind, erschwert. Inzwischen gibt es mehrere mono- und polyklonale

AK.<sup>189,194,195</sup> Benecke et al.<sup>196</sup> testeten AK, die gegen fünf verschiedene synthetische Peptide gerichtet waren. Diese Peptide wurden aufgrund intensiver Untersuchungen der Struktur von ChAT als potentiell antigene Epitope ausgewählt. Dabei hat z. B. der polyklonale AK, der gegen Peptid 3 gerichtet ist, sehr gute Ergebnisse beim Nachweis von cholinergen Neuronen im enterischen Nervensystem erzielt.<sup>197</sup>

Die immunocytochemische Methode konnte durch in situ-Hybridisierungstechnik, die das gleichzeitige Vorkommen der *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) des Enzyms in den untersuchten Regionen nachwies, verifiziert werden.<sup>198-200</sup>

Mit der beschriebenen Methode konnten ChAT-immunreaktive Strukturen zuerst im Gehirn und Rückenmark in unterschiedlichen Spezies nachgewiesen werden<sup>195,201-203</sup> Die Detektion im PNS, wie z. B. in den Spinalganglien<sup>204</sup> und prävertebralen Ganglien wie dem Ggl. mesentericum inferius<sup>205</sup>, präganglionären Neuronen<sup>206</sup>, postganglionären sympathischen Neuronen<sup>56</sup> oder dem enterischen Nervensystem<sup>180,197</sup>, gelang erst später.<sup>56</sup>

Bei Untersuchungen mit unterschiedlichen Neurotransmittern und -peptiden wurden häufig Kollokalisierungen von ChAT mit Neuropeptiden wie VIP, SP und *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP) beobachtet.<sup>53,207,208</sup>

### 1.3 Fragestellung

Wie zuvor erwähnt, ist der Plexus tympanicus schon vor 200 Jahren in seiner Struktur beschrieben worden. Im Laufe der Zeit wurden weitere Methoden entwickelt, um anatomische Strukturen nicht nur makroskopisch und mikroskopisch zu beschreiben. Beispielsweise brachten Tracer-Studien neue Erkenntnisse zu den Nervenverläufen und ihrem Anteil am Aufbau des Plexus tympanicus.<sup>35,209</sup> Neben der Topographie der einzelnen Strukturen kann mittels histologischer oder immunocytochemischer Färbung die Chemoarchitektur des Plexus tympanicus untersucht werden; bisher liegen jedoch nur sehr wenige derartige Untersuchungen vor.<sup>210-212</sup> Zu dieser Art der Untersuchung zählt auch die vorliegende Arbeit.

Da der Plexus tympanicus mit seinen Konnektivitäten über verschiedene Hirnnerven und den Plexus caroticus, seinen unterschiedlichen Qualitäten und Transmittern ein sehr interessantes, komplexes Geflecht darstellt, dessen Funktion und Stellenwert als Teil des Nervensystems nur ansatzweise erforscht ist, erscheint eine intensivere Funktionsmorphologische Analyse unbedingt notwendig.<sup>34</sup> Die vorliegende Arbeit an verschiedenen Transmittersystemen des Plexus tympanicus versucht, durch die Ergebnisse weitere Erkenntnisse über Funktionen und Pathologien, die im Zusammenhang mit dem Plexus tympanicus stehen, zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit soll neben den Neurotransmittern des sympathischen und parasymphatischen Nervensystems die Chemoarchitektur der Neuropeptide NPY, VIP und SP untersucht werden. Dabei sind folgende Detailfragen zu klären:

- Kommen die Neurotransmitter (Acetylcholin und Noradrenalin) und Neuropeptide (NPY, VIP, SP) im Plexus tympanicus der Wistar-Ratte vor?
- Wie ist die Verteilung der Neurotransmitter und -peptide innerhalb des Plexus tympanicus und in Beziehung zu den Strukturen des Mittelohrs der Wistar-Ratte?

- Gibt die Verteilung Hinweise auf eventuelle Kollokationen von NPY, VIP und SP mit sympathischen oder parasympathischen Transmittern oder stellen diese Systeme integrative Komponenten dar?

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Versuchstiere**

Für die Untersuchung wurden vier Laboratoriums-Ratten des Wistar-Auszucht-Strains benutzt. Nach Lieferung der Ratten durch die Firma Charles River (Sulzfeld, Germany) wurden die Tiere in Makrolon-Käfige überführt, 7 Tage in unserem Tierstall bei freiem Zugang zu Futter (Altromin 1324, Lage, Germany) und Wasser unter einer Beleuchtungsperiode von 12:12 Licht-Dunkel-Rhythmus (LD) eingewöhnt und danach der Perfusionsfixierung zugeführt.

### **2.2 Materialgewinnung**

Die Gewebeprobe des Mittelohrs der Ratte wurde nach Perfusionsfixierung gewonnen. Dazu wurden die Versuchstiere zunächst in einem gasdicht verschließbaren Glasbehälter durch Atemnarkose (Forene®, AbbVie, Wiesbaden, Germany) betäubt und anschließend durch eine intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (Nembutal®, 25mg/kg Körpergewicht, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Hannover, Germany) tief narkotisiert. Danach wurde der Thorax eröffnet, das Herz freigelegt, eine Knopfkanüle in den linken Ventrikel inseriert und das rechte Atrium eröffnet. Zunächst wurde mit isotonischer Kochsalzlösung, die Heparin (Ratiopharm, Ulm, Germany; 10.000 I.E./l) enthielt, bis zur Blutleere (ca. 2-3 min) gespült, danach erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; 4% in 0,1M Phosphatpuffer).

Für die Gewebeentnahme wurde die Kopfhaut entfernt und der gesamte Os temporale-Komplex einschließlich des äußeren Gehörgangs und der anliegenden Muskulatur präpariert und der Nachfixierung in identischer Fixans (3 Tage) zugeführt. Anschließend erfolgte die Entkalkung (Entkalker Soft, Roth, Karlsruhe, Germany) über 4 Wochen (Wechsel der Entkalkungslösung jeden 2. bis 3. Tag) bei Raumtemperatur.

Von drei Ratten wurden die bilateralen Gewebelöcke ( $\cong$  6 Mittelohrproben) in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit Saccharose (10%, 20%, 30% in Puffer jeweils 24h) infiltriert und sodann auf Trockeneis gefroren. Anschließend wurden Kryostatschnitte (16  $\mu$ m) in serieller Auszugsserie (6 Parallelserien) auf gelatinierte Objektträger aufgezogen.

Diese standen für die immunocytochemischen Analysen zur Verfügung.

Von einer Ratte wurden die beiden bilateral symmetrischen Gewebelöcke in Paraffin eingebettet. Die anschließend hergestellten Paraffinschnitte wurden entsprechend der Protokolle der klassischen Histologie mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und dienten als morphologische Referenzserie.

### **2.3 Immunocytochemische Aufarbeitung der Kryostatschnitte**

Zur Untersuchung der Neurotransmitter- und Neuropeptidsysteme im Bereich des Mittelohrs und der benachbarten Strukturen der Ratte wurden die nach Abschnitt 2.2 hergestellten Gefrierschnitte immunocytochemisch angefärbt. Dabei wurden für einen bestimmten Färbevorgang Serienschnitte des gleichen Tieres benutzt, um eine vergleichbare Färbungsintensität zu erhalten. Die verwendeten Primärantikörper waren gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH), Substanz P (SP), Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) gerichtet. Von jedem Tier wurden jeweils 7-10 Objektträger mit je 6-8 seriell geordneten Gefrierschnitten gefärbt. Durch den Vergleich von Färbeergebnissen bei mehreren Individuen konnten regelhaft vorkommende Färbungen gegenüber sporadisch auftretenden Fehlmarkierungen erkannt werden. Für die Vergleichbarkeit hinsichtlich der Intensität der Färbung innerhalb der Serien wurde streng darauf geachtet, immer die komplette Serie in einem Färbevorgang zu bearbeiten.

Interindividuelle Unterschiede in der Färbung waren aufgrund der nicht vorgesehenen Quantifizierung ohne weitere Bedeutung.

Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde für alle gewählten Antikörper eine Verdünnung von 1:500 ausgewählt. Es wurden zuvor mehrere Konzentrationen an Primärantikörpern getestet, wobei diese Verdünnung die besten Ergebnisse gezeigt hat: die Hintergrundfärbung war relativ gering und die spezifische Färbung maximal kontrastiert.

Um Fehler grundlegend zu vermeiden, wurde mit einem strengen Färbeprotokoll gearbeitet, welches die Verdünnungen und Inkubationszeiten, sowie die Inkubationstemperatur exakt vorgibt.

Gewisse Schwankungen und damit verbundene leicht unterschiedliche Ergebnisse - gerade interindividuell - lassen sich natürlich trotzdem nicht vollkommen ausschließen.

In den folgenden Abschnitten werden sowohl die immunocytochemischen Grundlagen wie auch das genaue Vorgehen bei den Färbungen erläutert.

### 2.3.1 Grundlagen der Immunocytochemie

Immunocytochemie beruht auf der Interaktion zwischen einem spezifischen Antiserum mit seinem Antigen. Dabei bindet der Antikörper (AK) des Antiserums sehr spezifisch nur einen kleinen Bereich - Epitop genannt - auf dem Antigen. Ein Epitop besteht gewöhnlich aus 5-8 Aminosäuren oder 1-6 Monosacchariden.<sup>213</sup> Die AK binden zumeist an Proteine, jedoch gibt es auch AK, die Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren erkennen.

Üblicherweise werden Immunglobulin G (IgG) -AK für die Immunocytochemie benutzt. Dabei besteht dieses Glycoprotein aus zwei schweren und zwei leichten Ketten und hat zwei Antigenbindungsstellen.<sup>213</sup> Für die immunocytochemische Nachweismethode werden häufiger polyklonale als monoklonale AK verwendet. Polyklonale AK werden beispielsweise in Kaninchen oder Ziege hergestellt, monoklonale AK dagegen in Maus oder Ratte. Dafür werden die Tiere mit einem Antigen immunisiert. Daraufhin wandeln sich B-Zellen in Plasmazellen um, die AK gegen verschiedene Epitope des Antigens bilden. Diese AK befinden sich

dann im Serum, das leicht gewonnen und ohne weitere Aufreinigung für die Immuncytochemie genutzt werden kann.

Auf weitere Details der AK-Herstellung soll hier verzichtet werden.

Für die besten Ergebnisse einer immuncytochemischen Färbung sollten AK eine hohe Avidität, Affinität, Spezifität und Sensitivität aufweisen.<sup>213</sup>

Es wird eine direkte Technik, bei der lediglich markierte Primärantikörper zur Bindung an ein spezielles Antigen benutzt werden, von einer indirekten Technik unterschieden, bei der mehrstufig mit verschiedenen Zweit- oder Drittantikörpern zur Detektion der spezifischen Primärantikörper gearbeitet wird.<sup>55</sup>

Die indirekte Methode wird aufgrund ihrer hohen Sensitivität für die vorliegende Arbeit bevorzugt.

Zur Visualisierung der detektierten Proteine dient in der vorliegenden Studie eine Peroxidasereaktion. Das Enzym Peroxidase ist über eine Avidin-Biotin-Kopplung mit dem Antikörperkomplex verbunden.

Wichtig ist es, als ersten Schritt die endogene Peroxidase zu blocken, damit dieses in allen Zellen vorkommende Enzym keine unspezifischen Hintergrundreaktionen mehr katalysieren kann. Obwohl daraus eine geringere Antigenität und Sensitivität resultiert, ist dieser Schritt notwendig. Gerade für Gewebe, die eine hohe Aktivität an endogener Peroxidase besitzen, wie beispielsweise Knochenmark, Endothelien oder die Milz, ist eine Blockierung erforderlich.<sup>214</sup>

Grundlegend wird die Avidin-Biotin-Complex (ABC) -Methode in drei Stufen eingeteilt, die im Folgenden kurz erklärt und visuell dargestellt werden. Eine detailliertere Ausführung der Färbung inklusive der wichtigen Spül- und Blockierschritte ist unter Abschnitt 2.3.3 zu finden.

Basierend auf der hohen Affinität von Antikörpern zu Antigenen werden die histologischen Schnitte zunächst mit einem primären AK inkubiert, dessen spezifische Bindungsstellen gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet sind. Die hier verwendeten polyklonalen Primärantikörper wurden zuvor in Kaninchen, Ziege oder Maus hergestellt und binden spezifisch ihre jeweiligen Antigene, hier eines der beiden Enzyme ChAT oder DBH oder eines der drei Neuropeptide



NPY, SP oder VIP. Im Anschluss wird ein Sekundärantikörper verwendet, der aus einem zum Primärantikörper heterologen Wirt stammt. Dieser Sekundärantikörper vom IgG-Typ ist gegen die IgG-Fraktion der Tierart gerichtet, aus der das spezifische Antiserum gewonnen wurde. Entsprechend bindet der Sekundärantikörper an den konstanten Teil des Antikörpers: den F<sub>c</sub>-Teil (*c = crystallizable*) des Primärantikörpers. Außerdem ist der Sekundärantikörper biotinyliert und kann damit die Verbindung zum Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex herstellen.

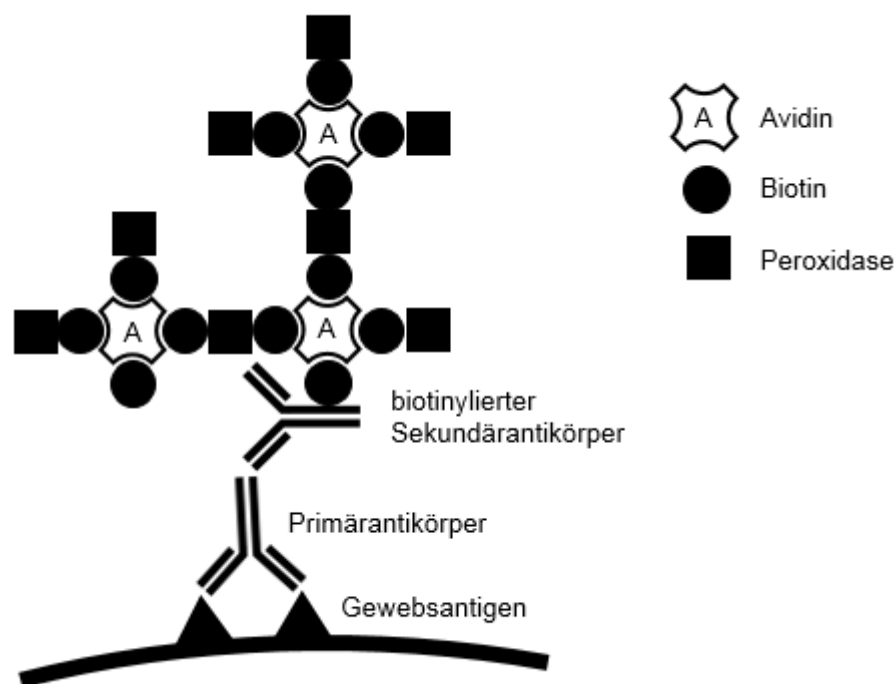


Abbildung 16: ABC-Methode. Modifiziert nach Oliver und Jamur 2010.

Die ABC-Methode ist in Abb. 16 dargestellt. Sie basiert auf der irreversiblen Bindung zwischen Biotin und Avidin. Biotin ist ein Vitamin, welches sich durch seine hohe Affinität zu Avidin auszeichnet (Dissoziation  $10^{-14}\text{M}$ ). Darüber hinaus kann Biotin sehr gut mit dem Enzym Peroxidase verbunden werden. Avidin ist ein 68.000 Dalton großes Eiweiß aus dem Hühnerei, welches vier Bindungsstellen für Biotin besitzt.<sup>55</sup> Der ABC-Komplex besteht aus einem zentralen Glykoprotein Avidin mit drei durch Biotin-Peroxidase besetzten Bindungsstellen. Die freie Bindungsstelle dient der Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers.

Durch eine hohe Anzahl von Biotinmolekülen am Sekundärantikörper können viele mit Peroxidase-gekoppelten Avidinmoleküle binden und das Signal verstärken.<sup>215</sup> Wichtig ist die Kopplung an das Enzym Peroxidase, weil darüber der Avidinkomplex und somit auch das vom Primärantikörper gebundene Antigen über eine Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Diese besteht in der Übertragung von Wasserstoff aus Diaminobenzidin (DAB) auf Wasserstoffperoxidmoleküle. Dabei entsteht aus den DAB-Molekülen ein System aus ungleich langen konjugierten Doppelbindungen, die im sichtbaren Lichtspektrum braun erscheinen. Obwohl das pH-Optimum für die Peroxidase bei 5 liegt, wird die Reaktion bei einem pH-Wert von 6,0-7,6 ausgeführt, um die Reaktion etwas zu verlangsamen und das Ergebnis zu differenzieren.<sup>216</sup> Bei dieser Reaktion dient Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) als Substrat und das Chromogen Diaminobenzidin als Elektronendonator. In vereinfachter Art ist diese Reaktion in Abb. 17 dargestellt.

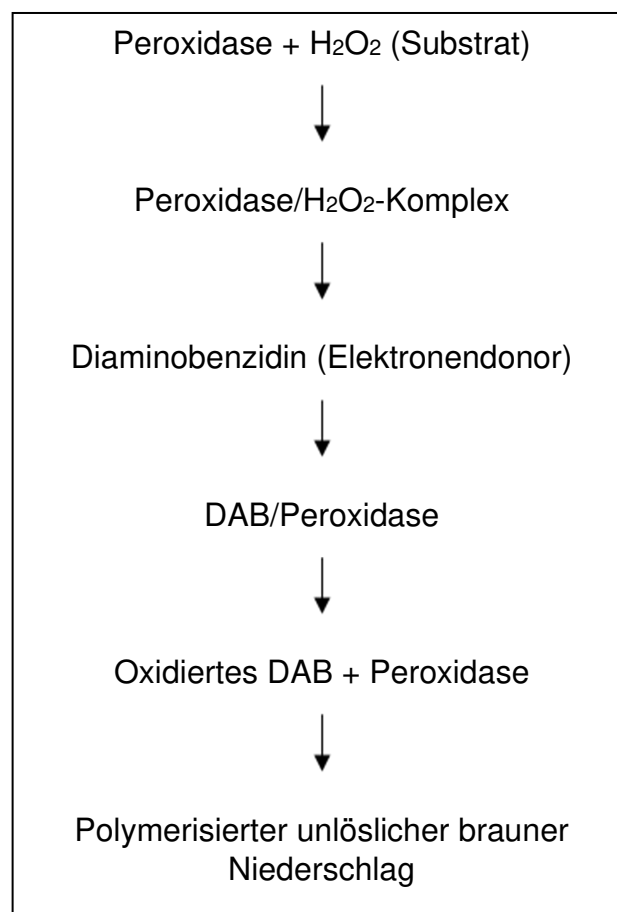


Abbildung 17: Vereinfachter Mechanismus der Peroxidasereaktion mit DAB und  $H_2O_2$ . Modifiziert nach Polak und van Noorden 2003.

Das Enzym selbst wird nicht verbraucht und kann daher bis zur gewünschten Intensität die Reaktionen katalysieren.

Es resultiert ein unlöslicher dunkelbrauner Niederschlag an der Stelle der Reaktion.<sup>216</sup> Diese findet an den gebundenen Antikörpern statt, so dass sich die detektierten Antigene mit einem ausreichenden Kontrast vom umliegenden Gewebe abheben.

Molekulare Interaktionen zwischen Antikörpern und den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexen sorgen bei genügend langer Reaktionszeit stufenweise für eine Verstärkung des Signals, sodass auch eine geringe Menge an Primärantikörpern zu einer deutlichen Visualisierung führt. Die ABC-Methode weist dadurch eine hohe Sensitivität auf und wurde für diese Arbeit präferiert.

### 2.3.2 Benötigte Reagenzien

Für die immunocytochemische Aufarbeitung der Gefrierschnitte wurden neben Antikörperlösungen folgende weitere Reagenzien und Puffer benötigt. Die Puffer wurden vor Beginn der Versuchsreihe in ausreichender Menge eigens hergestellt, sodass eine Pufferlösung für alle Färbungsschritte benutzt werden konnte. Zum Ansetzen der Puffer wie auch zum Spülen wurde destilliertes Wasser benutzt. Die genauen Zusammensetzungen der Pufferlösungen sind im Anhang aufgeführt.

1. PBS (*Phosphate buffered saline*) -Puffer: 0,02M Phosphatpuffer; pH = 7,4; 0,9% Kochsalz
2. PBS-T (Triton) -Puffer: 0,02M Phosphatpuffer; pH = 7,4; 0,9% Kochsalz, 0,3% Triton X-100 (AppliChem, Darmstadt, Germany)
3. Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) -Puffer: 0,05M Tris-Lösung (AppliChem, Darmstadt, Germany); pH = 7,4
4. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ , 30%-ige Stammlösung) (AppliChem, Darmstadt, Germany)
5. Methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
6. BSA (*bovine serum albumin*) Rinderserumalbumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
7. DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

8. Primärantikörper:

- a. ChAT: *Anti-Choline Acetyltransferase antibody* ab6168, *rabbit polyclonal to Choline Acetyltransferase, Isotype: IgG* (abcam, Cambridge, UK)
- b. DBH: *Anti-Dopamine  $\beta$  Hydroxylase antibody* ab189991, *goat polyclonal to Dopamine  $\beta$  Hydroxylase, Isotype: IgG* (abcam, Cambridge, UK)
- c. SP: *Anti-Substance P antibody* ab14184, *mouse monoclonal to Substance P, Isotyp IgG* (abcam, Cambridge, UK)
- d. NPY: *Anti-Neuropeptide Y antibody* ab30914, *rabbit polyclonal to Neuropeptide Y* (abcam, Cambridge, UK)
- e. VIP: *Anti-VIP antibody (M-19) sc-7841, goat polyclonal to VIP* (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)

9. Sekundärantikörper:

- a. *Anti rabbit IgG, produced in goat* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- b. *Anti goat IgG, produced in rabbit* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- c. *Anti mouse IgG, produced in goat* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

10. ExtrAvidin®-Peroxidase (HRP (*horseradish peroxidase*) -gekoppelt) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); ExtrAvidin® ist die Handelsbezeichnung von Avidin, das die Firma Sigma-Aldrich vertreibt.

11. Ethanol (J.T. Baker, Fisher Scientific, Schwerte, Germany)

12. Xylol (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Schwerte, Germany)

13. Entellan (Merck, Darmstadt, Germany)

Tabelle 1: Verwendete Vorinkubationslösung.

Substanz	Lieferant	Arbeitsverdünnung
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany	5%

Tabelle 2: Liste verwendeter Primärantikörper.

Wirt	Spezifität gegen	Lieferant	Arbeitsverdünnung
Kaninchen	Cholin-Acetyl- Transferase	abcam, Cambridge, UK	1:500
Ziege	Dopamin- $\beta$ - Hydroxylase	abcam, Cambridge, UK	1:500
Ziege	Vasoaktives intestinales Peptid	Santa Cruz, Dallas, Texas, USA	1:500
Kaninchen	Neuropeptid Y	abcam, Cambridge, UK	1:500
Maus	Substanz P	abcam, Cambridge, UK	1:500

Tabelle 3: Liste verwendeter Sekundärantikörper.

Wirt	Spezifität gegen	Lieferant	Arbeitsverdünnung
Ziege	Kaninchen-IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany	1:100
Ziege	Maus-IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany	1:100
Kaninchen	Ziege-IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany	1:100

### 2.3.3 Immuncytochemisches Färbeprotokoll

Die verschiedenen immuncytochemischen Färbungen wurden jeweils innerhalb von zwei Tagen im Laboratorium des Anatomischen Instituts II der Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt, wobei zur besseren Vergleichbarkeit stets auf identische Bedingungen und Inkubationszeiten geachtet wurde. Die Inkubation erfolgte immer bei Raumtemperatur. Für die Immuncytochemie wurden dafür vorgesehene apparative Vorrichtungen benutzt, sodass immer je 10 Objektträger pro Färbedurchgang bearbeitet werden konnten.

Nachdem die fixierten Kryostatschnitte einige Minuten an der Raumluft getrocknet wurden, wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

#### Tag 1:

1. Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3%-iger Wasserstoffperoxidlösung in Methanol für 10 Minuten
2. Spülen in PBS
3. Dreimaliges Waschen mit PBS-T für jeweils 5 Minuten
4. Vorinkubation für 30 Minuten in 5%-iger Rinderserumalbumin-(BSA)-Lösung
5. Inkubation über Nacht (12 Stunden) mit dem jeweiligen Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in PBS-T mit 5% BSA. Experimentell wurde in einer Versuchsreihe eine Verdünnung von 1:500 als optimal bewertet und die ausgewerteten Schnitte alle mit dieser Verdünnung gefärbt.

Die Gefrierschnitte wurden in einer geschlossenen Inkubationsbox vor Verdunstung geschützt.

## Tag 2:

1. Dreimaliges Waschen mit PBS-T für jeweils 5 Minuten
2. Inkubation für 60 Minuten mit dem biotinkoppelten Sekundärantikörper. Dieser AK muss sich gegen die konstante Region des Primärantikörpers richten, daher wird der Sekundärantikörper speziesspezifisch ausgewählt: in dieser Versuchsreihe wird ein in der Ziege produzierter Sekundärantikörper (Anti-rabbit IgG bzw. Anti-mouse IgG) bei einem Primärantikörper aus dem Kaninchen oder der Maus verwendet. Die Verdünnung mit PBS-T beträgt 1:100.
3. Dreimaliges Waschen mit PBS-T für jeweils 5 Minuten
4. Inkubation für 60 Minuten mit HRP-gekoppeltem ExtrAvidin. Die Verdünnung mit PBS-T beträgt 1:100.
5. Dreimaliges Waschen mit PBS-T für jeweils 5 Minuten
6. Einmaliges Waschen mit Tris-Puffer für 5 Minuten
7. Farbreaktion: 100mg DAB in 200ml Tris lösen und 100µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Stammlösung) dazugeben, in dieser Lösung werden die Gefrierschnitte für ca. 4 Minuten inkubiert
8. Kurzes Spülen in destilliertem Wasser, um die Farbreaktion zu stoppen
9. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:
  - 70% Alkohol für 2 Minuten
  - 80% Alkohol für 2 Minuten
  - 90% Alkohol für 2 Minuten
  - 96% Alkohol für 2 Minuten
  - 100% Alkohol zweimalig für jeweils 2 Minuten
  - Xylol zweimalig für jeweils 5 Minuten
10. Eindeckeln mit Entellan



## 2.4 Auswertung und Analyseverfahren

Die Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena). Über eine Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Jena), die auf das Lichtmikroskop montiert war, wurden Detailaufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Im Anschluss wurden diese mit Einsatz eines Bildbearbeitungsprogramms (Adobe Photoshop CS3, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) zugeschnitten und auf identische Hintergrundhelligkeit angepasst.

Die Übersichtsdarstellungen der immunocytochemischen Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Zeichentubus, der als Zubehör an das o.g. Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena) montiert war, erstellt. Die Zeichnungen der Präparate wurden anschließend gescannt und mit Photoshop bearbeitet sowie entsprechend der Gewebearten schematisch eingefärbt. Daraus wurden zehn Skizzen ausgewählt, die eine maßstabgetreue Übersicht über das Mittelohr und die umgebenden Bereiche boten. Der Fokus lag besonders auf dem Mittelohr und den umgebenden Nervenzellansammlungen (Ganglien) und Nervenfasern.

Im Anschluss wurden auf die Übersichtsskizzen (s. Abschnitt 3.2) wieder unter Zuhilfenahme des Bildbearbeitungsprogramms verschiedenfarbige Punkte gesetzt, die die Antigen-spezifische immunocytochemische Färbung symbolisieren. Dabei wurde die Größe des Punktes standardisiert und lediglich über die Anzahl der eingezeichneten Punkte ermittelt, in welchen Bereichen besonders viele Strukturen markiert wurden.

Da mit Serien des gleichen Tieres gearbeitet und der Maßstab korrekt beibehalten wurde, können mit Hilfe der Übersichtsskizzen Vergleiche zwischen den verschiedenen Neurotransmittern und -peptiden gezogen werden. Dabei kann sowohl die Lokalisation als auch die Dichte des Vorkommens in Relation gesetzt werden.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Immuncytochemische Befunde an Peptid- und Transmittersystemen im Plexus tympanicus**

Für alle untersuchten Transmitter- und Peptidsysteme lassen sich spezifisch gefärbte Strukturen erkennen. Generell konnte die Immunfärbung in Faserprofilen und in Perikaryen beobachtet werden. Wesentlich häufiger ließen sich Faserprofile auffinden, wobei sich Varikositäten besonders deutlich gegenüber der stets vorhandenen, jedoch relativ schwachen Hintergrundfärbung erkennen ließen. Immungefärbte Perikaryen konnten sowohl in größeren Ganglien als auch solitär nachgewiesen werden.

In den folgenden Abschnitten bezeichnet die Abkürzung „ir“ das Adjektiv immunreaktiv und „IR“ das Nomen Immunreaktivität. Die Maßstäbe der Aufnahmen sind den Abbildungen zu entnehmen.

##### **3.1.1 Vasoaktives intestinales Peptid**

Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) konnte nach immuncytochemischer Färbung in Gefäßwänden des gesamten Ohrbereichs aufgefunden werden. Sowohl Kapillaren als auch größere Blutgefäße (besonders Arterien) zeigten über alle Präparate hinweg Nervenfasern mit Reaktivität gegenüber VIP (Abb. 18). Dabei konnten perikapilläre Boutons gefunden werden, die VIP stark anreicherten. Die sequentielle Anordnung dieser Boutons markierte den Verlauf der Nervenfasern (Abb. 18D)

In kleineren Gefäßen sowie am Rand der größeren Arterien und Venen ließen sich vereinzelt angefärbte Erythrozyten nachweisen, die sich jedoch am ehesten aufgrund der hohen Konzentration endogener Peroxidase unspezifisch angefärbt haben (Abb. 18C). Diese Färbung wies auch nur geringere Intensität auf, dies spricht ebenfalls dafür, dass diese Blutzellen nicht spezifisch für VIP tingiert waren.

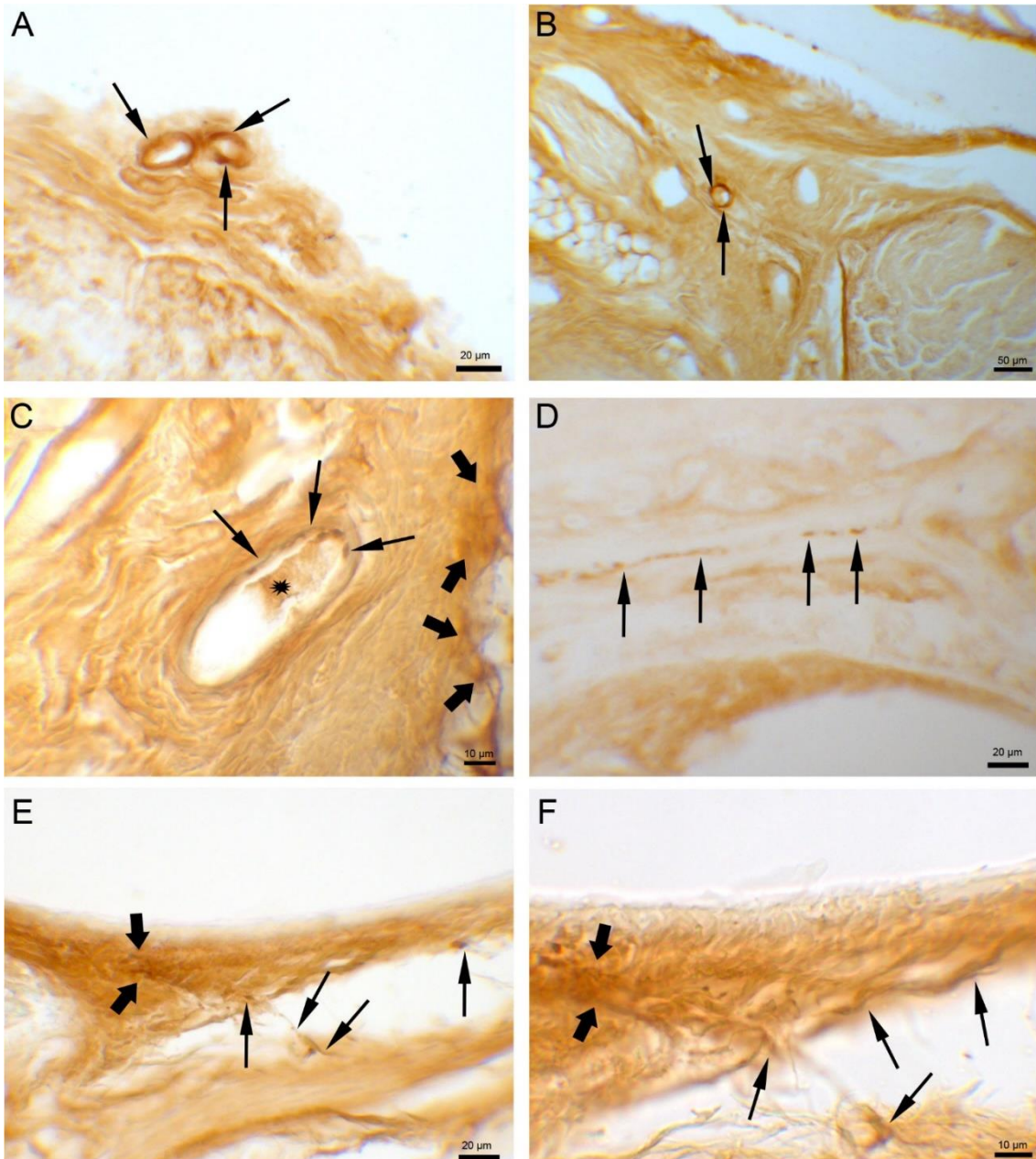


Abbildung 18: Perikapilläre VIP-ir Fasern (A und B). VIP-ir Faserverknotungen in Arteriolenwand (C). VIP-ir Nervenfasern direkt an einer Gefäßwand (D). VIP-positive Zellen und Fasern begleiteten ein großes Gefäß, zugehörige Fasern kamen aus tieferen Gewebsschichten (E und F).

**dicker Pfeil:** VIP-ir Perikaryen

**dünner Pfeil:** VIP-ir Nervenfasern

**Sternchen:** unspezifisch gefärbte Erythrozyten

Von Interesse waren vor allem die spezifischen Markierungen im Mittel- und Innenohr sowie diejenigen von Ganglien und größeren Nervenbahnen. Jedoch ließen sich auch VIP-ir Elemente in der Muskulatur, in Drüsen und im Bindegewebe beobachten (Abb. 19).

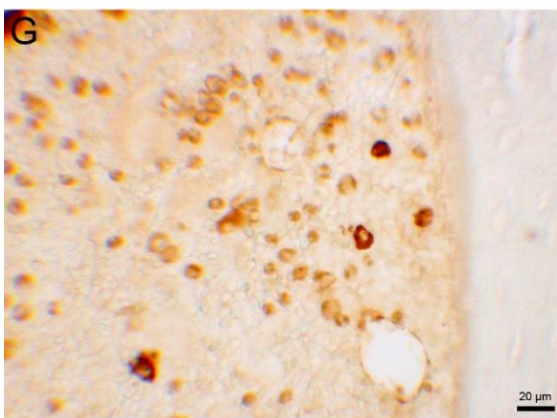
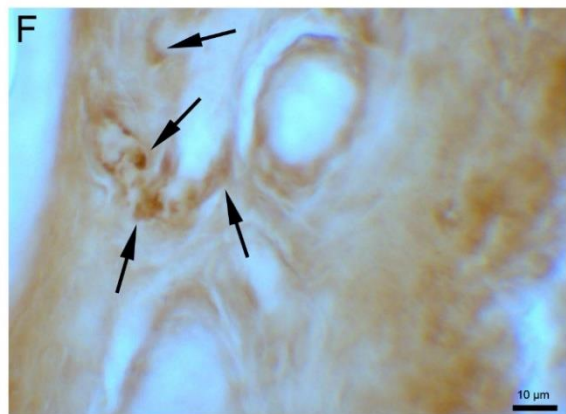
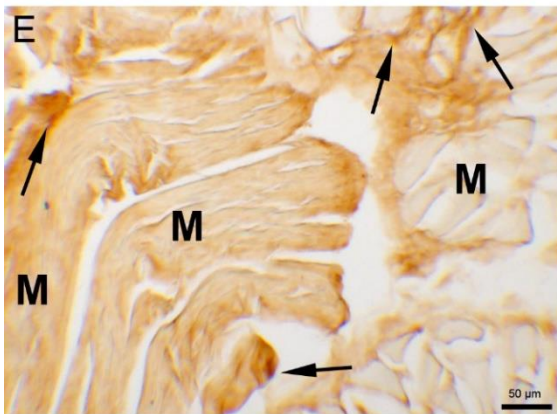
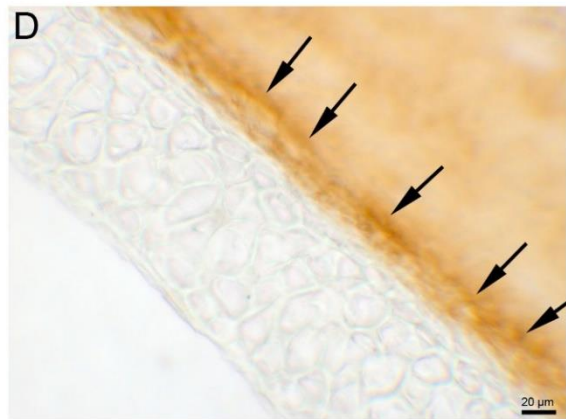
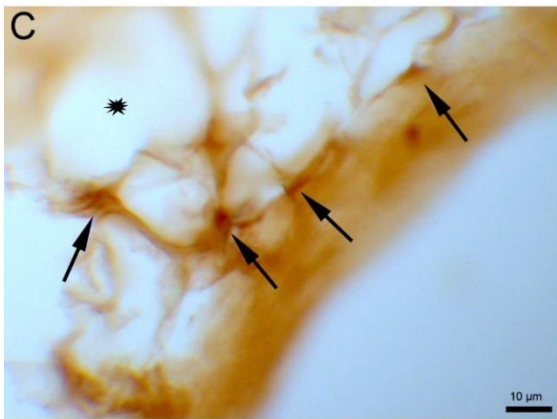
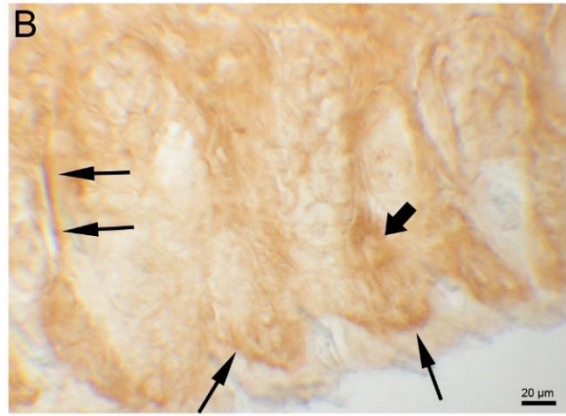
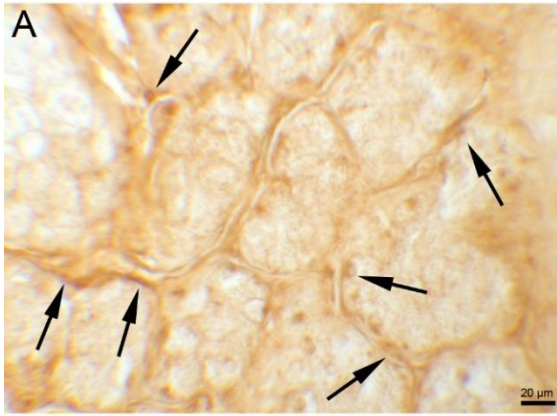
In kleinen Lakunen im Knochen ließen sich einzelne Zellen, sowie im Knochenmark große Zellansammlungen anfärben, die Merkmale von Zellen der Erythropoese zeigen und deshalb eher eine unspezifische Tingierung darstellen (Abb. 19G). Die Faserprofile in den Haversschen Kanälen waren dagegen spezifisch gefärbt und repräsentieren gefäßbegleitende VIP-ir Nervenfasern (Abb. 19H).

Die Gll. ceruminiferae (Abb. 19B) des äußeren Gehörgangs zeigten nur geringen Gehalt an VIP-ir Fasern, aber vor allem in den Bindegewebsformationen zwischen und basal der Drüsen ließen sich viele VIP-positive Epithelzellen finden, die auch Faserverbindungen in die Tiefe besitzen.

Ein ähnliches Erscheinungsbild bot sich in der Gl. parotidea (Abb. 19A), die dem äußeren Gehörgang nahe lokalisiert war. Auch hier konnten VIP-ir Faserprofile und auch einige Perikaryen basal der Azini beobachtet werden.

*Abbildung 19: VIP-Markierung im Bereich der Glandula parotidea (A). Weniger starke Markierung im Bereich der Glandulae ceruminiferae des äußeren Gehörgangs (B). Auch im Binde-, Fett- und Muskelgewebe war VIP nachweisbar (C und E). Im Knorpelgewebe der Ohrmuschel fehlte VIP, lediglich im angrenzenden Bindegewebe erkannte man positiv gefärbte Fasern (D). Typische VIP-Anreicherung der Boutons im Bindegewebe (F). Das Knochenmark zeigte unspezifische VIP-Anfärbungen der Erythropoese (G). Haversscher Kanal mit VIP-ir Faserprofilen in Begleitung der Gefäße (H). S. Seite 77.*

**dicker Pfeil:** VIP-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** VIP-ir Nervenfasern  
**M:** Muskelfasern  
**Sternchen:** Fettvakuole



Auch im äußeren Gehörgang und im angrenzenden Gewebe waren VIP-positive Fasern lokalisiert. Im und unter dem Epithel des äußeren Gehörgangs wurden zahlreiche VIP-ir Nervenfasern und Varikositäten beobachtet (Abb. 20A, B). Die weiter apikal liegenden Nervenfortsätze zweigten sich von tiefer liegenden größeren Nervenfasern ab. Diese Fasern konnten teilweise bis in die Tiefe verfolgt werden. Von solchen Fasern konnten Äste nachgewiesen werden, die in kleinen Kanälen den Knochen penetrierten und so die Cavitas tympani erreichten (Abb. 20C).

Bei den Strukturen, die angefärbte Fasern enthielten, ließ sich nach anatomischer Lokalisation der N. vagus und damit das Vorkommen von VIP-ir Fasern innerhalb dieses Hirnnervens differenzieren.

Das Trommelfell zeigte nach immunocytochemischer VIP-Färbung an seiner Zirkumferenz dunkle Tingierung, die sich aber aufgrund von Randeffekten und aufgrund der strukturellen Merkmale als unspezifisch erkennen ließen. Lediglich am anulären Ansatz unmittelbar an den Seiten des Trommelfells und den angrenzenden Bindegewebsbereichen konnten einzelne VIP-ir Fasern und Zellen identifiziert werden (Abb. 20E, F). Das Trommelfell per se war jedoch VIP-negativ (Abb. 20D).

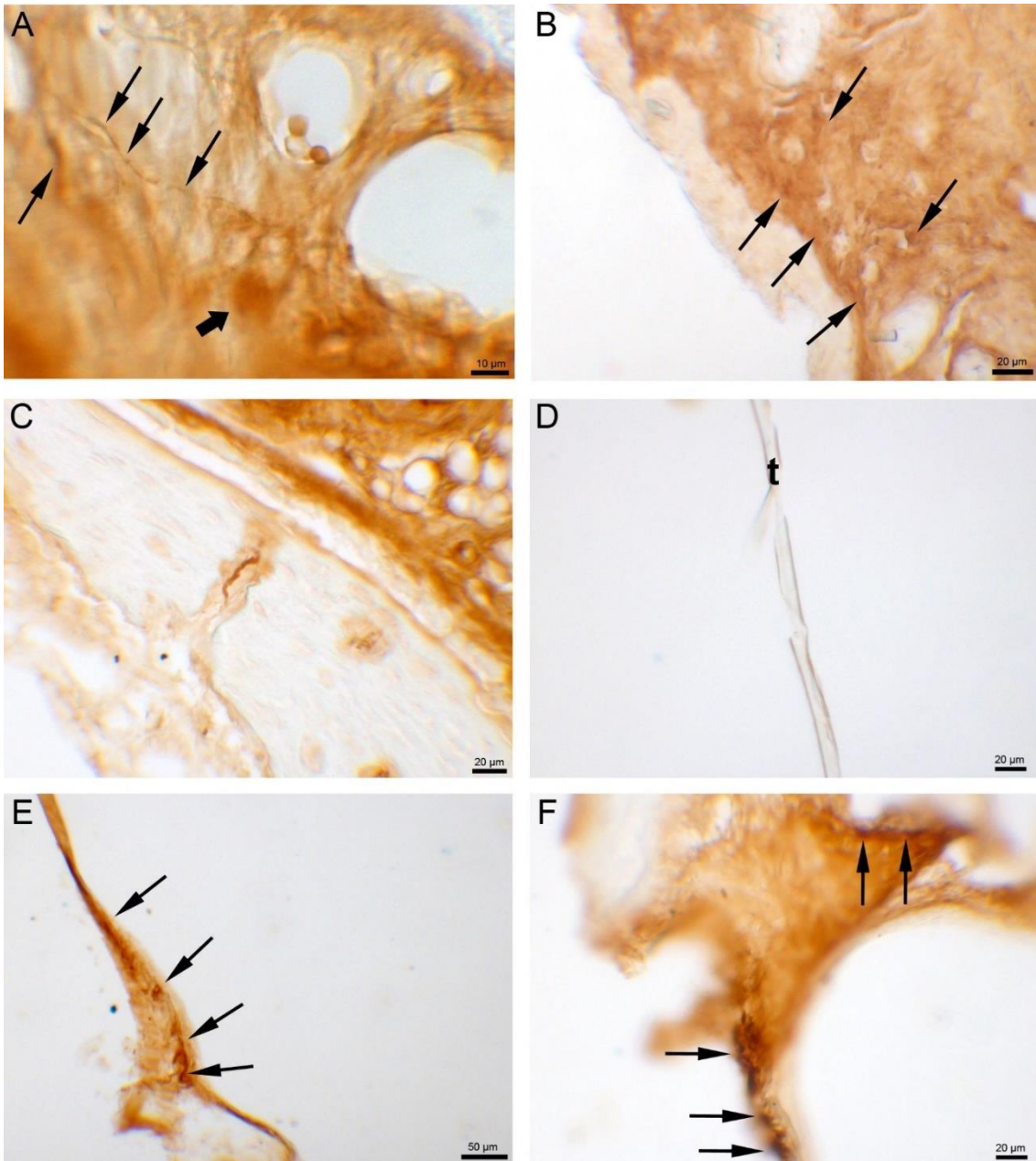


Abbildung 20: VIP-ir Elemente im äußeren Gehörgang (A und B). Diese standen mit tieferliegenden Nervenfasern in Kontakt. Sie penetrierten unter anderem den Knochen (C). Die Ansatzstellen des Trommelfells zeigten deutliche VIP-IR (E und F), im Trommelfell selbst wurde keine VIP-IR beobachtet (D).

**dicker Pfeil:** VIP-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** VIP-ir Nervenfaser  
**t:** Trommelfell

Im Epithel der Paukenhöhle waren VIP-positive Zellen und Fasern deutlich markiert.

Vor allem in dem Bereich des Mittelohrs, das der Cochlea von außen anliegt, konnte eine große Ansammlung dieser VIP-ir Elemente abgegrenzt werden. In diesem Gebiet ließen sich prismatische bis hochprismatische Zellen anfärben, die in einer aufgelockerten Schleimhaut lagen. Einige dieser Zellen reicherten das VIP-ir Material im apikalen Zellpol stark an. Dies deutet auf eine sekretorische Aktivität hin, durch die der Botenstoff im Sinne eines parakrinen Effekts in die Cavitas tympani abgegeben wird (Abb. 21A, B, C). Teilweise ließen sich apikal kleine abgeschnürte Vesikel-ähnliche Strukturen anfärben. VIP-Anreicherungen fanden sich daneben vor allem basal dieser Zellen (Abb. 21B, D). Die Zellpopulation war unterlagert von zahlreichen VIP-ir Nervenfasern, die an die beschriebenen Zellen heranreichten.

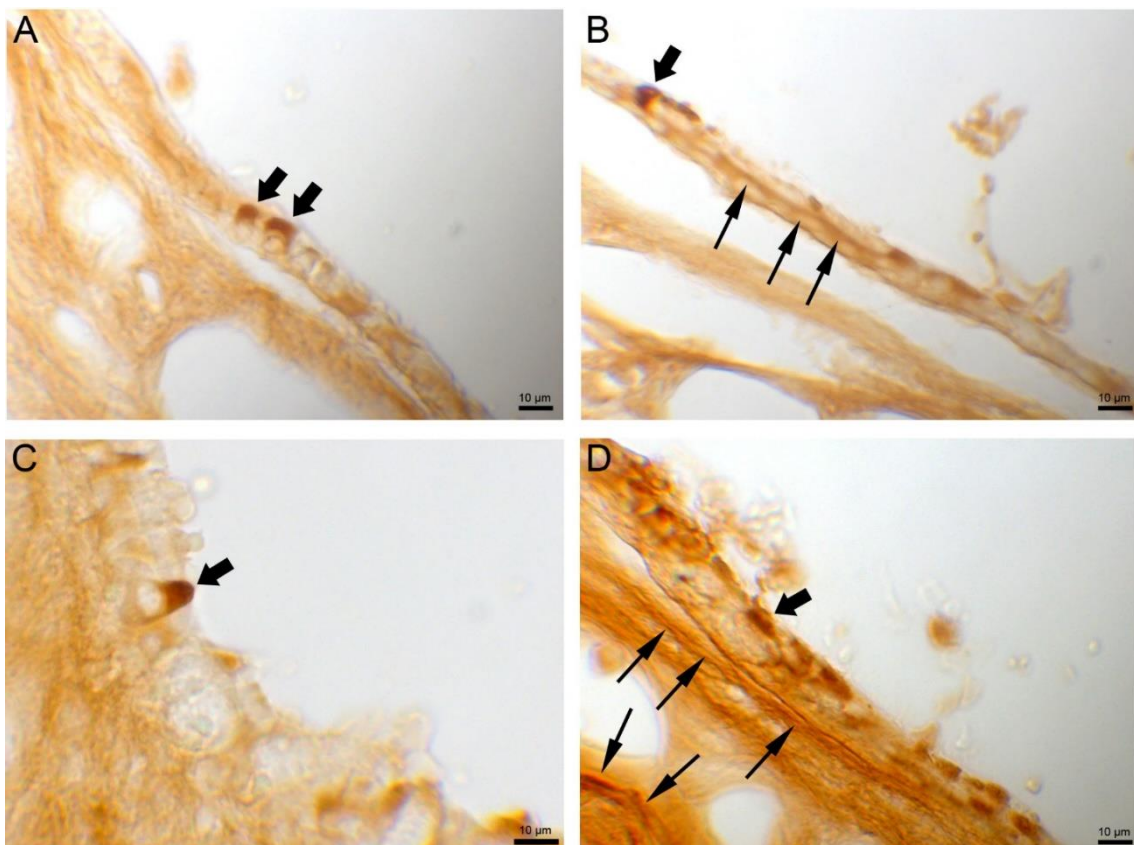


Abbildung 21: VIP-ir Zellen und Nervenfasern in der Mittelohrschleimhaut: sowohl in apikalen Schleimhautbereichen als auch in darunterliegenden Gewebeschichten (A - D).

**dicker Pfeil:** VIP-ir Perikaryen

**dünner Pfeil:** VIP-ir Nervenfasern



Auch in anderen Abschnitten der Mittelohrschleimhaut fanden sich VIP-ir Zellen und Faserstrukturen. Diese verliefen zwischen apikal gelegenen Zellen und den tiefer liegenden, größeren und parallel zum oberflächlichen Epithel verlaufenden Nervenfasern. Sofern VIP-positive Zellen vorhanden waren, kamen diese immer gehäuft in kleinen ganglienartigen Ansammlungen vor (Abb. 22).

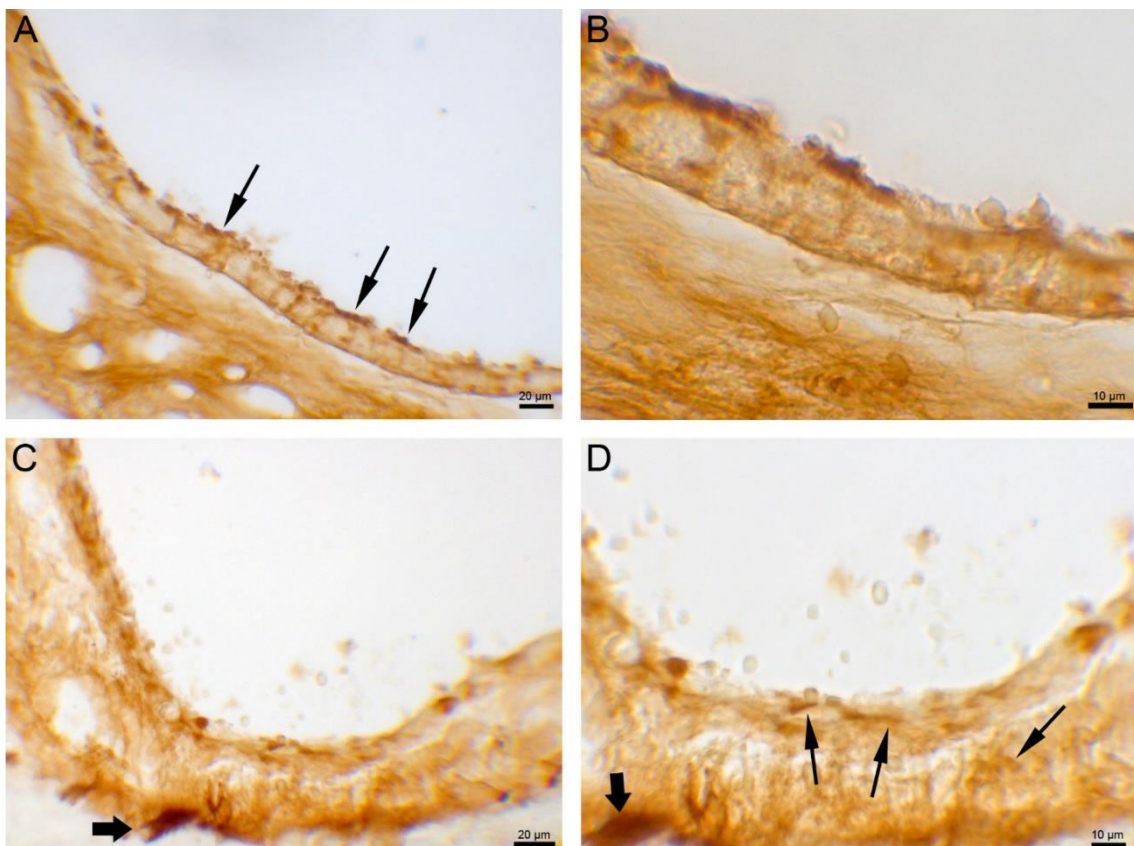


Abbildung 22: VIP-IR in der Mittelohrschleimhaut sowohl apikal als auch basal. Zuführende Nervenfasern lagen in den tieferen Gewebeschichten (A - D).

**dicker Pfeil:** VIP-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** VIP-ir Nervenfasern

Auffällig stark zeigten sich isolierte VIP-ir Varikositäten mit verbindenden Nervenfasern um den Steigbügel. Teilweise war dieses Geflecht in eine dünne Schleimhautschicht eingebettet, zum Teil lagen die Elemente auch direkt dem Knochen an (Abb. 23A, B, C).

Um Hammer und Amboss ließen sich ebenfalls VIP-ir Elemente beobachten, die jedoch verglichen mit dem Steigbügel nicht eine derartige Dichte aufwiesen. Diese Fasern waren eher eine Ansammlung in der Schleimhaut, die die Gehörknöchelchen umgibt (Abb. 23D).

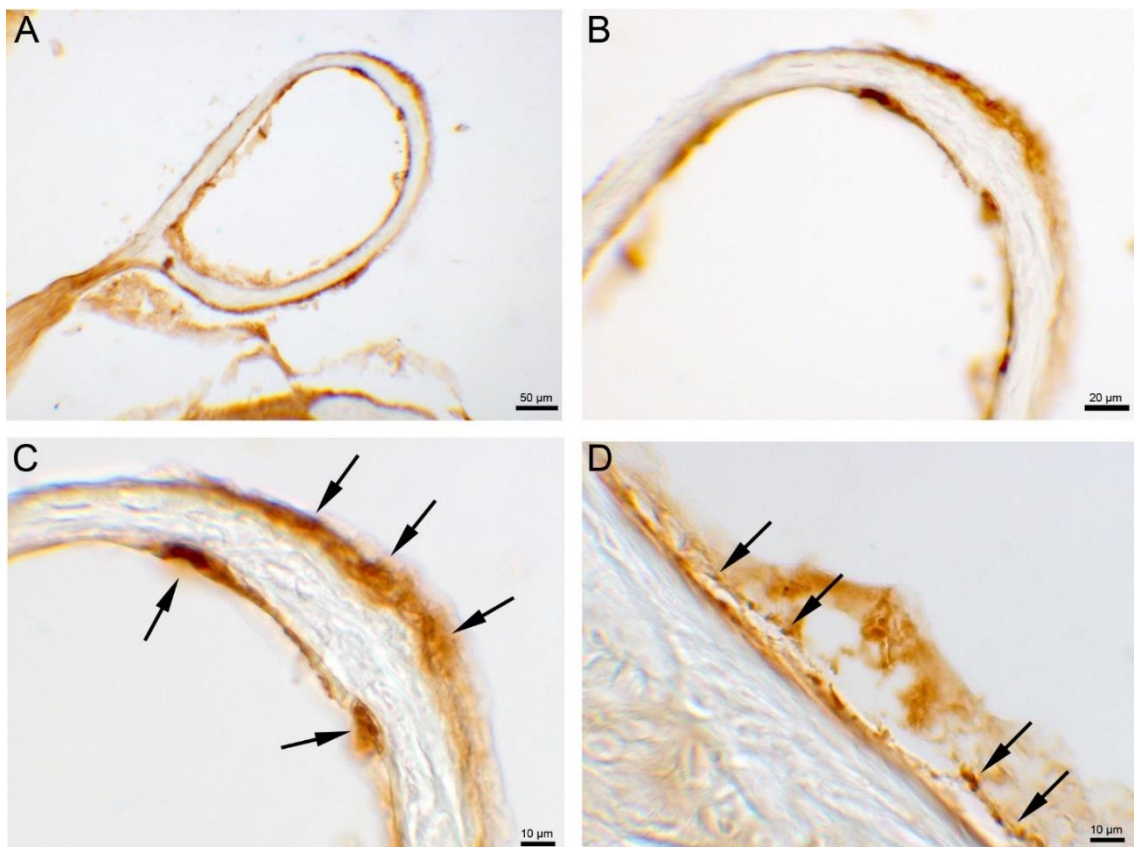
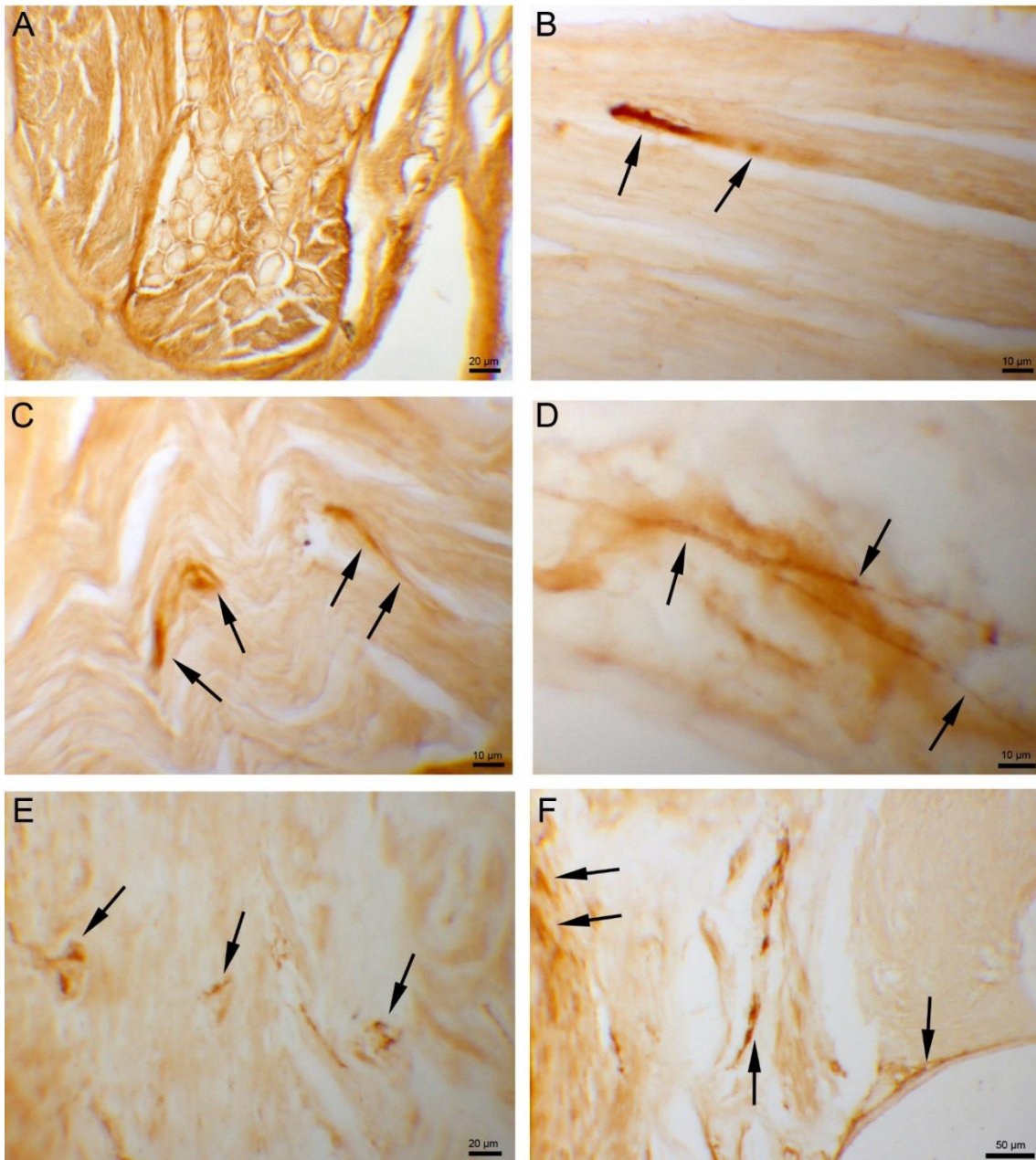


Abbildung 23: VIP-Markierungen um den Steigbügel (A – C) und in der umgebenden Schleimhaut von Hammer und Amboss (D).

**dünner Pfeil:** VIP-ir Nervenfaser

Innerhalb der großen Nerven und auch solitär durch das Gewebe ziehend fanden sich VIP-ir Nervenfasern (Abb. 24B - F). In den Ganglien dagegen ließen sich keine spezifischen für VIP gefärbten Nervenzellelemente nachweisen (Abb. 24A).



**Abbildung 24:** Keine VIP-ir Zellen im Ganglion (A). Innerhalb der großen Nerven deutliche VIP-ir Nervenfasern (B und C). In Richtung des Innenohrs ziehende VIP-positive Nervenfasern mit typischen Varikositäten (D – F).

**dünnere Pfeil:** VIP-ir Nervenfasern

Sowohl im Innenohr als auch im Gleichgewichtsorgan zeigten diverse Strukturen ein deutliches Vorkommen von VIP-IR. In der Cochlea fanden sich VIP-ir Fasern und teilweise Perikaryen in der Stria vascularis und im Corti-Organ. Außerdem erkannte man im umliegenden Gewebe Nervenfasern, die durch den Knochen des Modiolus zum Corti-Organ zogen und typische Varikositäten aufwiesen.

Im Corti-Organ konnten klar abgrenzbare VIP-ir Fasern an der Basis der Haarzellen (Abb. 25D) gefunden werden. Außerdem ließ sich eine derartige Faseranreicherung im oder um die Basilarmembran erkennen.

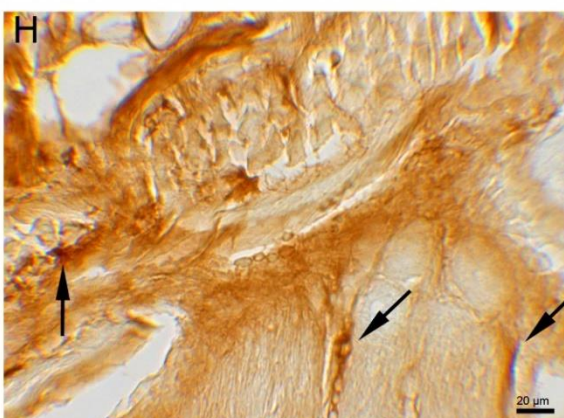
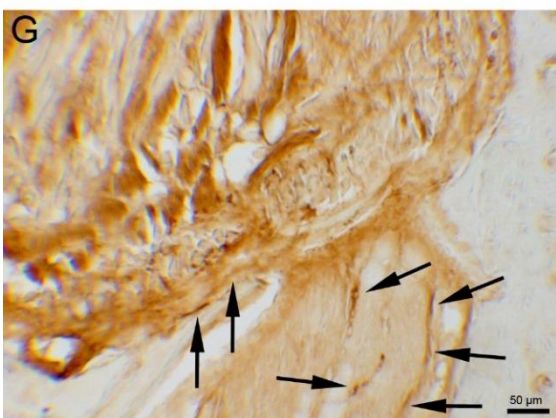
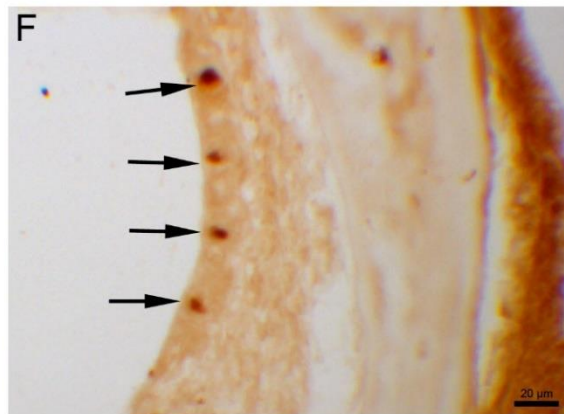
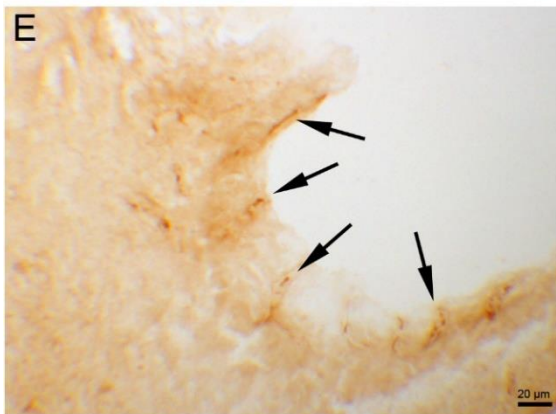
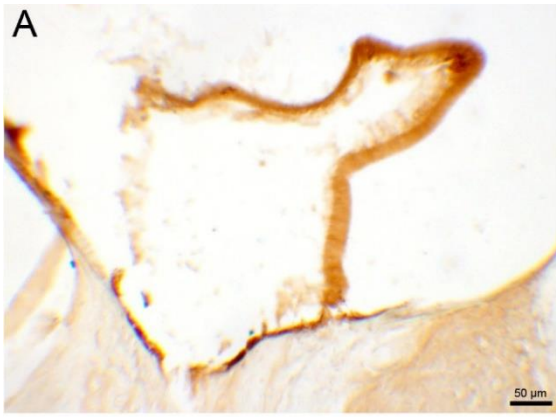
In der Stria vascularis zeigten sich feine VIP-ir Nervenfasernzüge und stark positive VIP-ir Strukturen in einer charakteristischen Anordnung.

VIP-ir Elemente konnten auch in und um die Bogengangsamullen nachgewiesen werden (Abb. 25A, B, C)

Genauso ließen sich im Ggl. cochleare und in beiden Anteilen des N. vestibulocochlearis VIP-ir Elemente nachweisen (Abb. 25G, H).

*Abbildung 25: VIP-IR im Epithel im Bereich der Bogengangsamulle (A - C). Basale VIP-IR an den Haarzellen des Corti-Organ (D). Die Stria vascularis enthielt VIP-ir Fasern (E und F). VIP-IR im Ganglion cochleare und im Nervus cochlearis (G und H). S. Seite 85.*

**dünner Pfeil:** VIP-ir Nervenfasern  
**Sternchen:** Haarzellen



### 3.1.2 Neuropeptid Y

Nach immunocytochemischer Färbung mit Antikörpern, die gegen Neuropeptid Y (NPY) gerichtet waren, zeigte sich eine intensive Anfärbung von Nervenfasern, die um die Gefäßwände gelagert waren (Abb. 26). Kleine Boutons um Kapillaren waren stark reaktiv, genauso wie umfangreiche Nervenfasergeflechte, die sich um große Gefäße legten (Abb. 26B). Diese Faserzüge zeigten charakteristische perlschnurartige Varikositäten auf. Auch innerhalb dickerer Gefäßwände ließen sich Schichten nachweisen, die IR gegenüber NPY zeigten (Abb. 26E), oder es waren feine NPY-ir Nervenfaserverläufe zu identifizieren (Abb. 26D). Die Dichte an NPY-ir Elementen war nahe der Gefäße insgesamt höher als in benachbarten Geweben.

Die Blutgefäße und Bindegewebsstränge, die durch den Knochen zogen, wurden von NPY-positiven Nervenfasern begleitet, die so mit der Schleimhaut der Cavitas tympani in Verbindung standen (Abb. 26F).

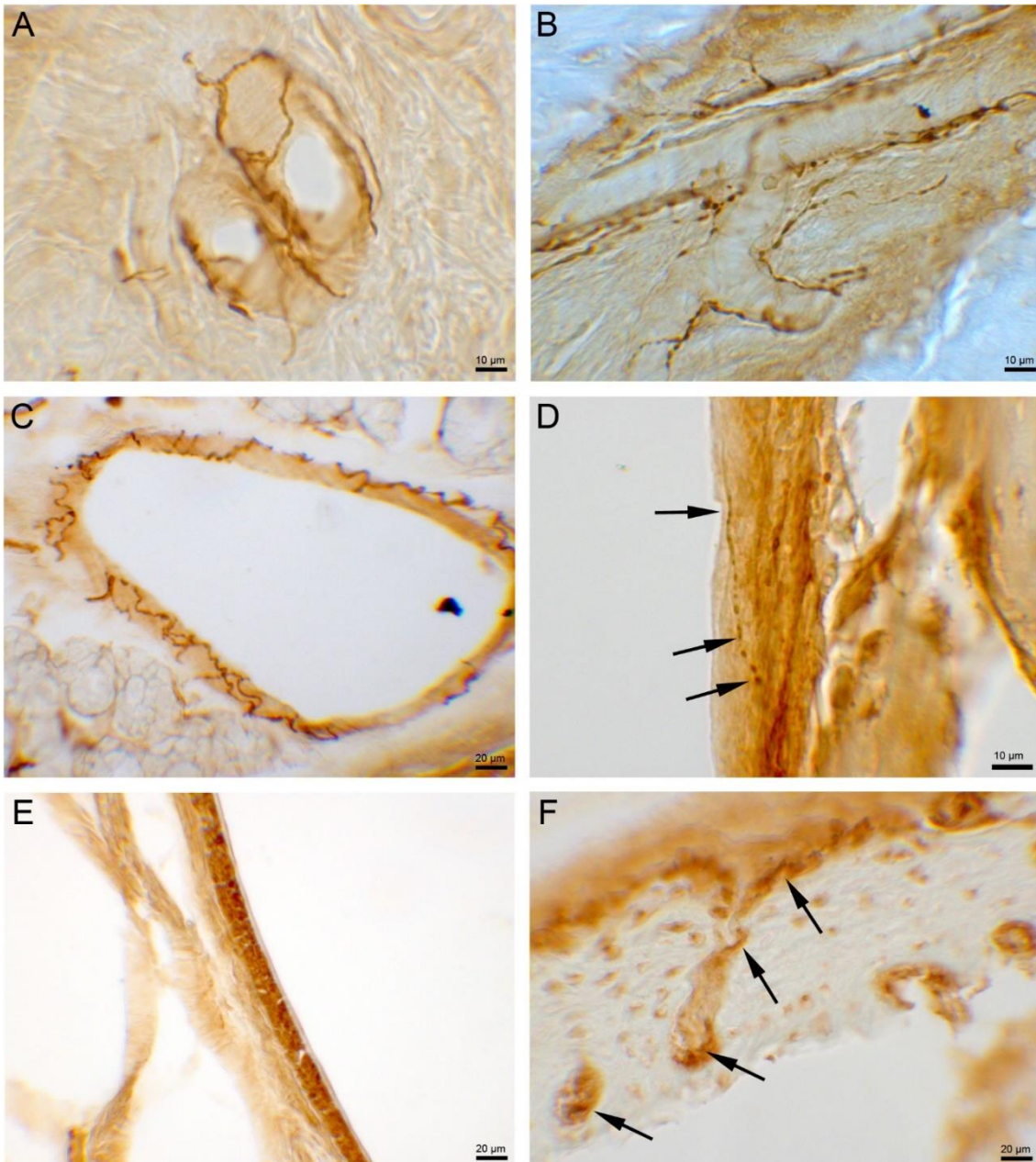


Abbildung 26: *Nervengeflecht mit NPY-IR um Gefäße unterschiedlicher Kaliber (A - C). Aneinander gereihte NPY-ir Boutons in der Gefäßwand (D). Muskelschicht einer Gefäßwand, die NPY-IR zeigte (E). Knochenkanal mit Bindegewebe, Gefäßanteilen und NPY-ir Elementen (F).*

**Pfeil:** NPY-ir Nervenfasern

In keiner der Drüsen, weder in der Gl. parotidea noch in den Gll. ceruminiferae des äußeren Gehörgangs ließen sich spezifisch NPY-ir Elemente erkennen. Jedoch konnten NPY-ir Nervenfasern beobachtet werden, die besonders an den apikalen Drüsenpol der Gll. ceruminiferae zogen (Abb. 27A - D).

Im äußeren Gehörgang konnten Nervenfaserverläufe nachgewiesen werden, die vor allem in tieferen Schichten liegen. Nach apikal wurden durch das gesamte Gewebe zarte Fasern abgegeben, die oberflächennah ein feines Netz bildeten. Es wurden einzelne Varikositäten gefunden, die durch NPY-ir Nervenfasern verbunden wurden (Abb. 27E). Auch zwischen den Drüsen konnten Äste von Nervenfasern mit NPY-IR identifiziert werden, die teilweise auch direkt zu den Drüsen zogen.

Im Bereich der zirkulären Ansatzzone des Trommelfells verdichteten sich die NPY-ir Fasern und wurden kräftiger (Abb. 27F). Das Trommelfell selbst war NPY-negativ. Die dunklen Randeefekte waren unspezifisch.



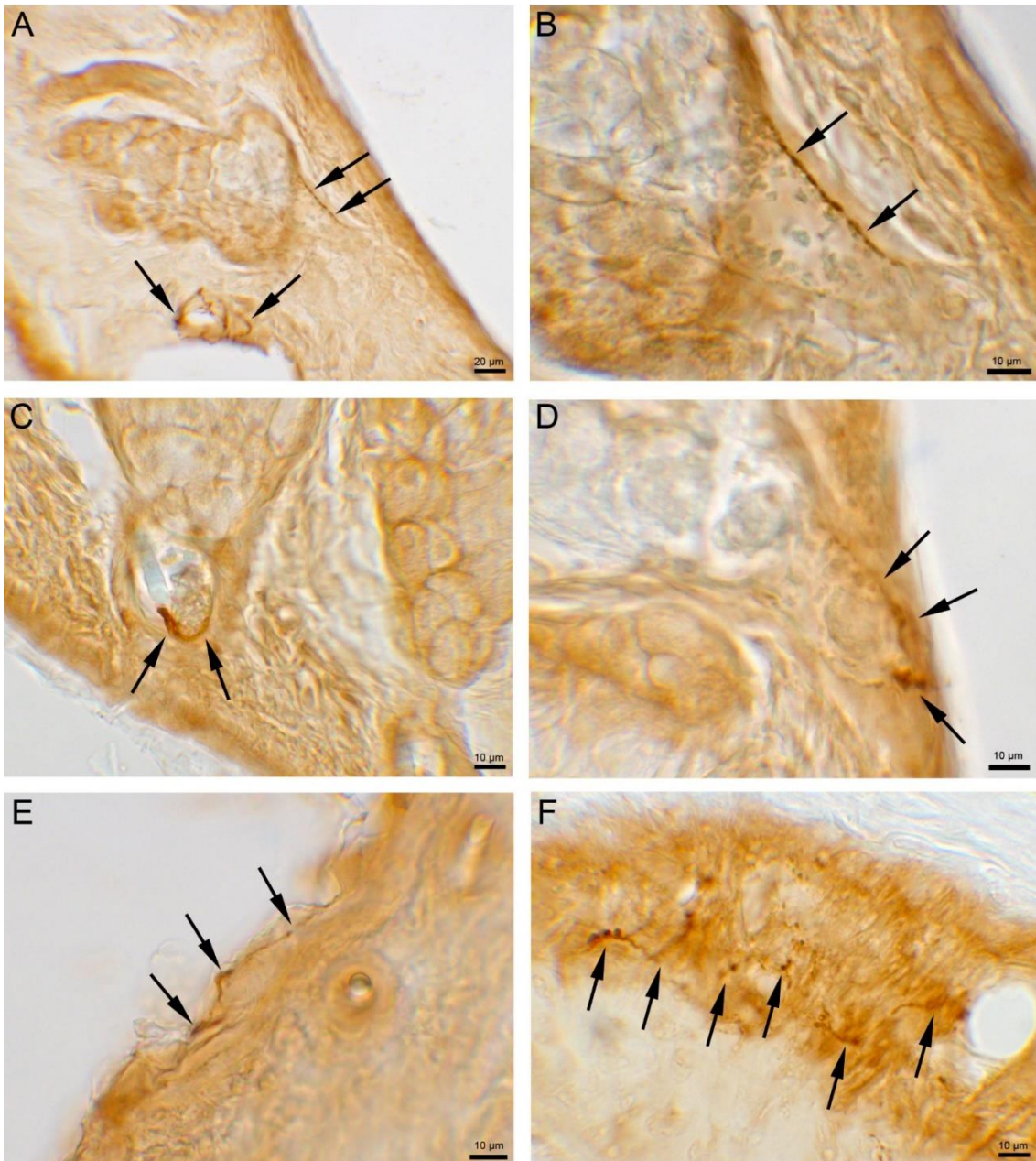
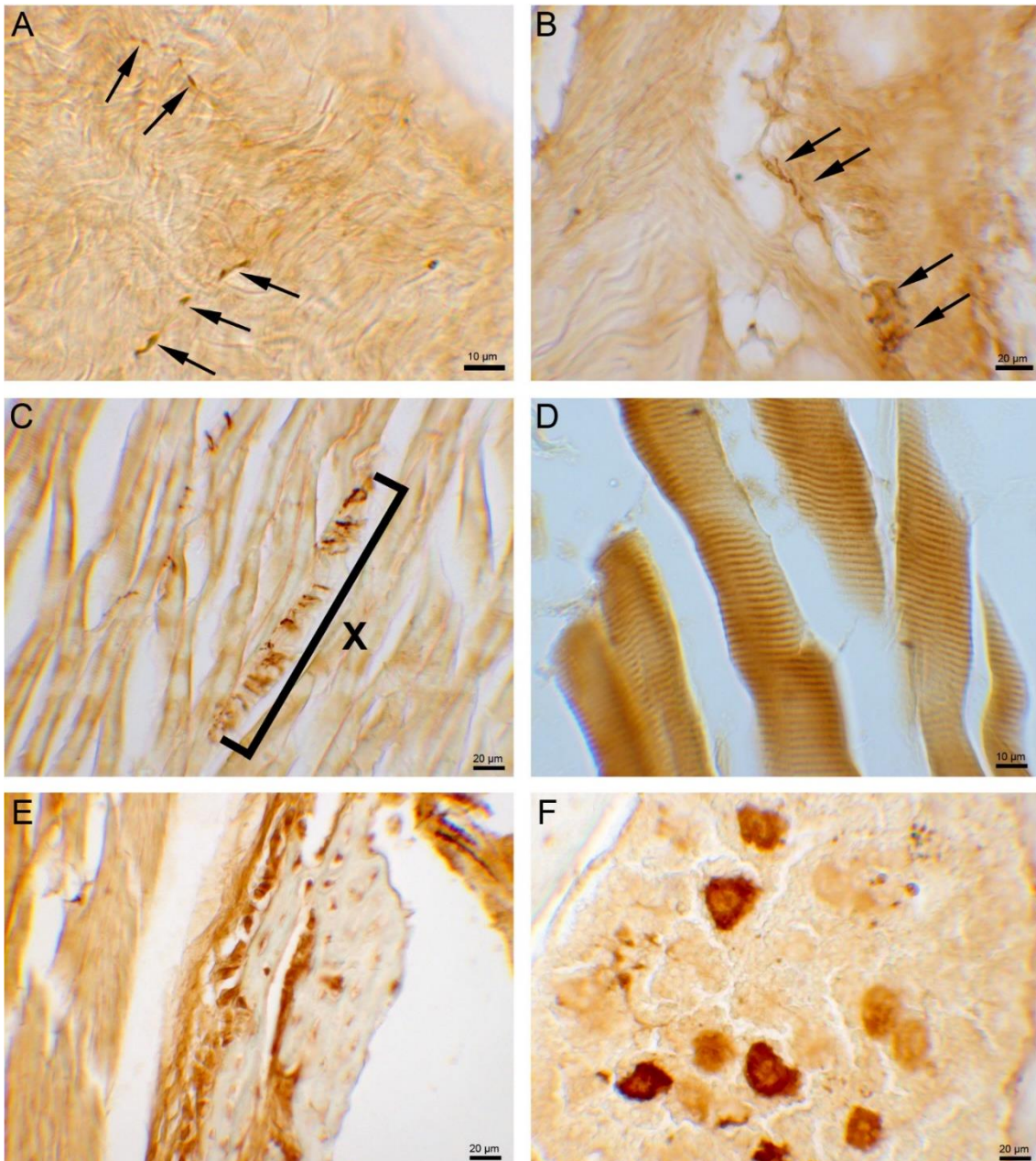


Abbildung 27: *Glandulae ceruminiferae* ohne NPY-ir Elemente, jedoch mit zuführender NPY-positiver Nervenfasern (A und B). NPY-IR am apikalen Drüsenpol (C und D). NPY-ir Elemente im Epithel des äußeren Gehörgangs (E). Perlschnurartig aneinander gereihete NPY-ir Boutons in direkter Nähe zum Ansatz des Trommelfells (F).

**Pfeil:** NPY-ir Nervenfasern

Weniger intensiv färbten sich Fasern im umliegenden Bindegewebe, in dem jedoch auch solitäre Nervenfasern mit NPY-IR identifiziert werden konnten (Abb. 28A). Im Fett- und Muskelgewebe ließen sich NPY-ir Elemente nachweisen. An vereinzelt Muskelfasern konnten motorische Endplatten identifiziert werden, die NPY-IR aufwiesen (Abb. 28C). Die Querstreifung der Muskulatur ließ sich bei hoher Apertur recht gut beobachten (Abb. 28D).

Das Stratum osteogenicum des Periosts zeigte aufgrund der hohen regenerativen Fähigkeit eine stärkere Hintergrundfärbung als die benachbarten Gewebe (Abb. 28E). Im Knochen wurden kleine Lakunen mit Blutgefäßen (Geflecht aus Havers- und Volkmann-Kanälen) und Knochenmark gefunden. Im Knochenmark wurden Zellen markiert, bei denen es sich am ehesten um Zellen der Erythropoese handelte. In beiden Lokalisationen kann von einer unspezifischen Tingierung aufgrund des endogenen Peroxidasegehalts und der hohen Syntheseleistung ausgegangen werden (Abb. 28F).



**Abbildung 28:** *Im Binde- und Fettgewebe, welches das Mittelohr umgibt, ließen sich NPY-ir Nervenfasern mit typischen Varikositäten nachweisen (A und B). In den Muskelfasern ließ sich die Querstreifung erkennen und es konnten motorische Endplatten identifiziert werden, die NPY-IR aufwiesen (C und D). Das Periost und regenerative Zellen im Knochenmark zeigten eine unspezifische Tingierung (E und F).*

**Pfeil:** NPY-ir Nervenfaser  
**X:** motorische Endplatte

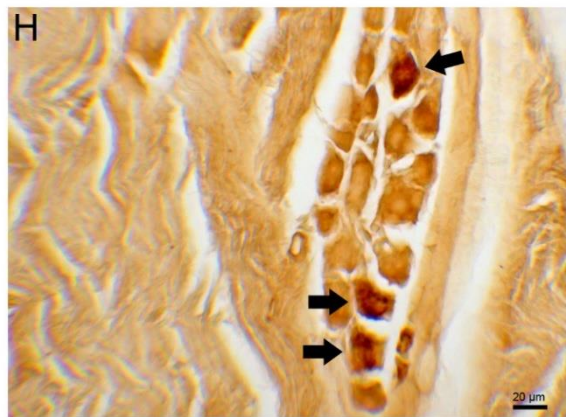
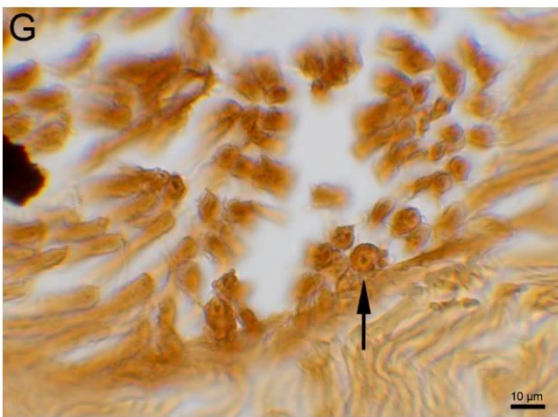
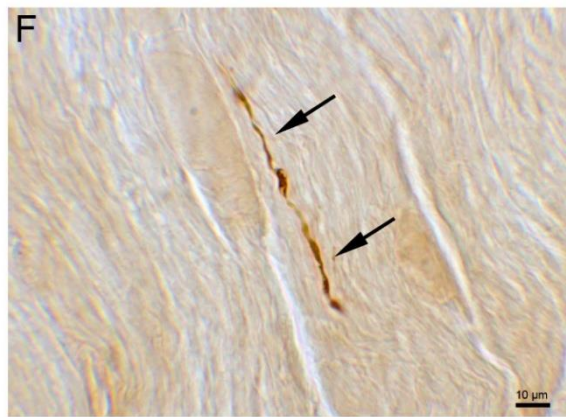
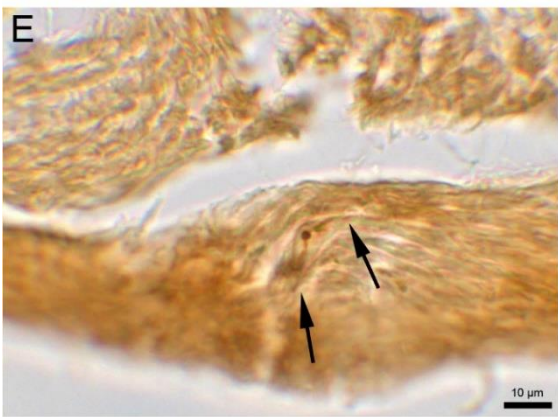
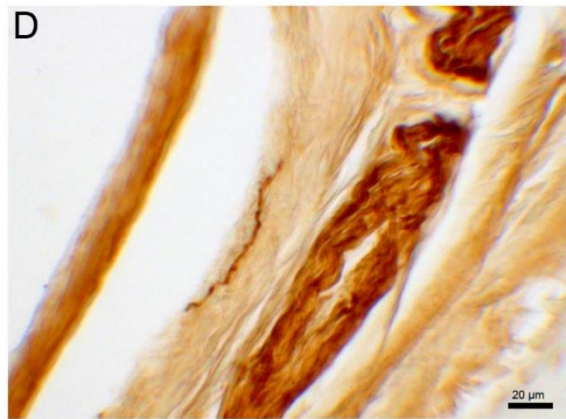
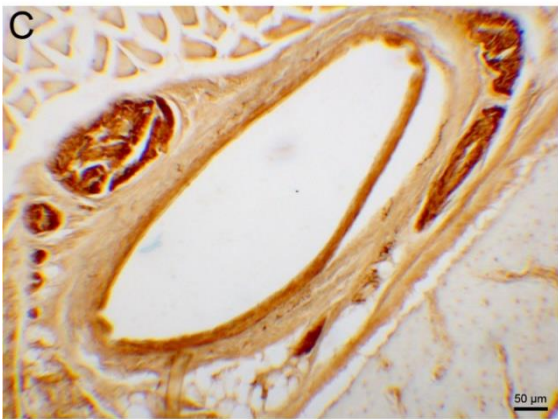
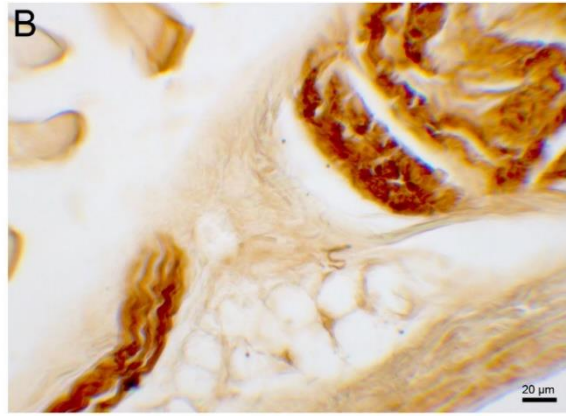
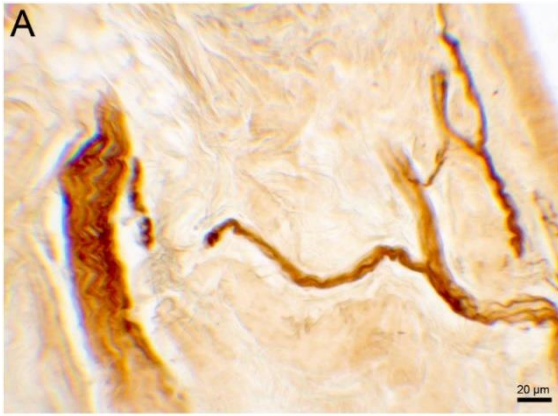
Es gab kleine Nerven, die eine intensive NPY-IR aufweisen und in ihrer Gänze gefärbt waren (Abb. 29A – D). Diese ließen sich nur an einer Lokalisation nahe der Cavitas tympani beobachten, konnten aber über viele Präparate hinweg verfolgt werden. Der Ursprungsnerv lag in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Gefäß und teilte sich in viele Äste auf, die das Gefäß begleiteten (Abb. 29A).

In den großen Nerven konnten einzelne NPY-ir Varikositäten und Nervenfasern (Abb. 29E, F) gefunden werden. Der Rest des Nervs hatte eine sehr viel schwächere Hintergrundfärbung als der Nerv in Abbildung 29A - D.

Innerhalb einiger Ganglien konnten NPY-ir Nervenzellperikaryen nachgewiesen werden (Abb. 29H). Außerdem fanden sich NPY-positive Axone (Abb. 29G).

*Abbildung 29: In unmittelbarer Nähe zur Cavitas tympani ließ sich ein Nerv identifizieren, der stark NPY-ir war (A – D). In und an der Gefäßwand lassen sich NPY-ir Elemente erkennen (C und D). Eine einzelne Varikosität (E) und Nervenfaser (F) mit NPY-IR in einem Nerven mit schwacher Hintergrundfärbung. NPY-ir Axone ließen sich in einem Nerven auffinden (G). Nervenzellen mit NPY-IR in einem Ganglion (H). S. Seite 93.*

**dicker Pfeil:** NPY-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** NPY-ir Nervenfaser



Die Mittelohrschleimhaut zeigte diverse NPY-markierte Strukturen. Neben durchziehenden Gefäßen, die von NPY-Nervenfasern begleitet wurden, konnten einzelne NPY-positive Varikositäten oder lange Faserverläufe identifiziert werden (Abb. 30A, B). Je nach Lokalisation wurden vor allem basal oder apikal intensive Markierungen und dazwischen Nervengeflechte und Boutons gefunden.

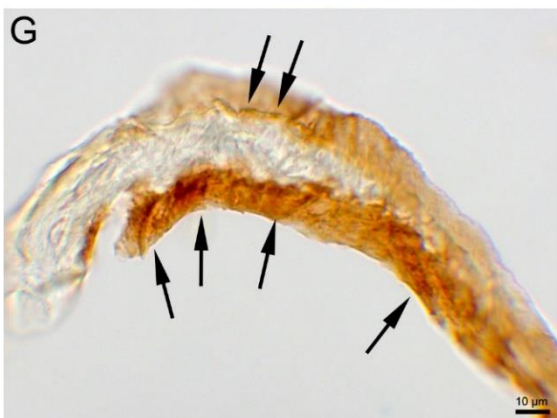
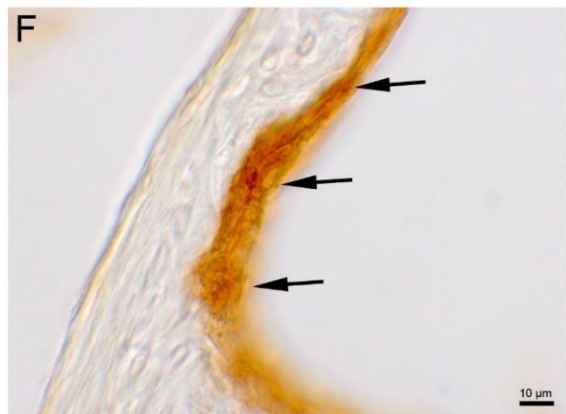
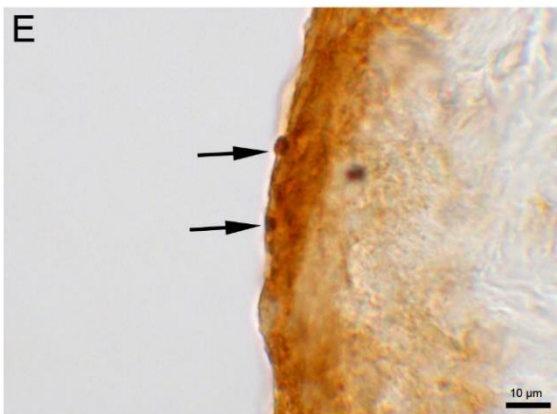
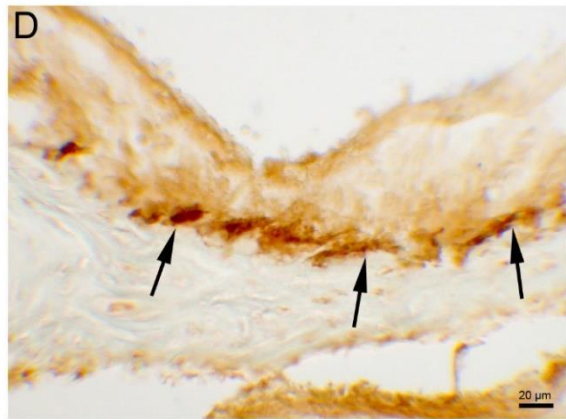
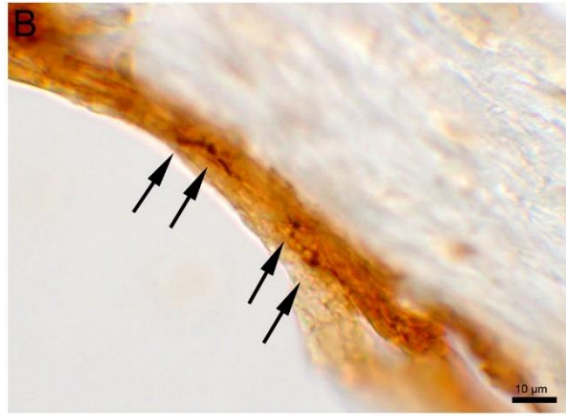
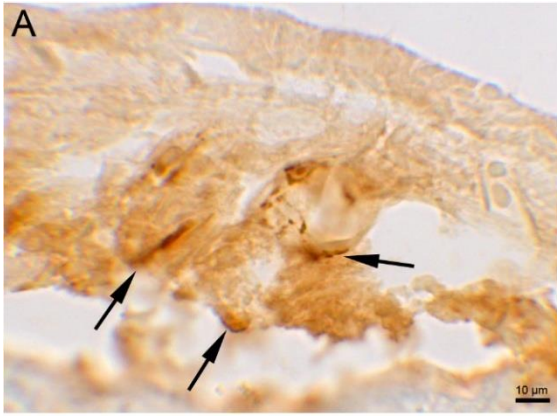
Im Bereich, in dem die Mittelohrschleimhaut der Vorwölbung der Schnecke, dem Promontorium, anliegt, war die Schleimhaut etwas aufgelockert und es ließen sich apikal aufliegende NPY-ir Elemente beobachten (Abb. 30C). Basal dem Knochen aufliegend konnten größere Strukturen mit intensiver NPY-IR nachgewiesen werden (Abb. 30D).

Im gegenüberliegenden Anteil der Cavitas tympani, in dem die Schleimhaut nicht so dick war, wurden eher einzelne apikal gelegene NPY-ir Boutons und zarte verbindende Fasern statt große Nervenfasergeflechte (Abb. 30E) gefunden.

In der Schleimhaut um die Gehörknöchelchenkette konnten NPY-ir Strukturen identifiziert werden. Vor allem um den Steigbügel waren zahlreiche NPY-positive Elemente zu beobachten, um Hammer und Amboss kamen diese in geringerer Anzahl vor (Abb. 30F – H)

*Abbildung 30: NPY-ir Elemente in der Mittelohrschleimhaut (A und B). Apikal aufgelagerte Elemente mit NPY-IR und basal dem Knochen aufliegende NPY-ir Strukturen (C und D). In anderen Bereichen konnten vereinzelt Varikositäten und Nervenfasern mit NPY-IR gefunden werden (E). NPY-positive Nervenfasern in der Schleimhaut, die dem Steigbügel anliegt (F und G). In geringerer Intensität und Anzahl konnten NPY-ir Elemente um Hammer und Amboss beobachtet werden (H). S. Seite 95.*

**Pfeil:** NPY-ir Nervenfaser



Im Innenohr und Vestibularapparat waren NPY-positive Elemente weit verbreitet. Zur Cochlea führend wurden NPY-ir Fasern, die bis an die Stria vascularis reichten, gefunden. Die Stria vascularis war von einem Netz aus NPY-ir Nervenfasern durchzogen, dabei konnten auch besonders lange NPY-ir Nervenfaserverläufe beobachtet werden (Abb. 31A).

Im Corti-Organ wurden vor allem an den Stützzellen, basal an den Haarzellen und der Basilarmembran NPY-ir Elemente (Abb. 31B) gefunden. Zu erkennen waren außerdem einzelne NPY-ir Nervenfasern mit Boutons in den Nerven, die zum Ggl. cochleare ziehen. Die Tektorialmembran wurde aufgrund von Kreuzreaktivität unspezifisch schwach angefärbt.

In den Bogengängen ließen sich vereinzelt NPY-ir Elemente beobachten (Abb. 31C, D).

In beiden Anteilen des N. vestibulocochlearis konnten NPY-positive Nervenfasern identifiziert werden. Im N. vestibularis ließen sich NPY-ir Nervenfasern nachweisen, die mit den Bogengangampullen in Verbindung standen (Abb. 31E). Im N. cochlearis waren Fasern mit eindeutiger NPY-IR nachweisbar, die vom Corti-Organ zum Ggl. cochleare zogen (Abb. 31F). Im Ggl. cochleare gab es keine spezifischen gefärbten NPY-ir Perikaryen.



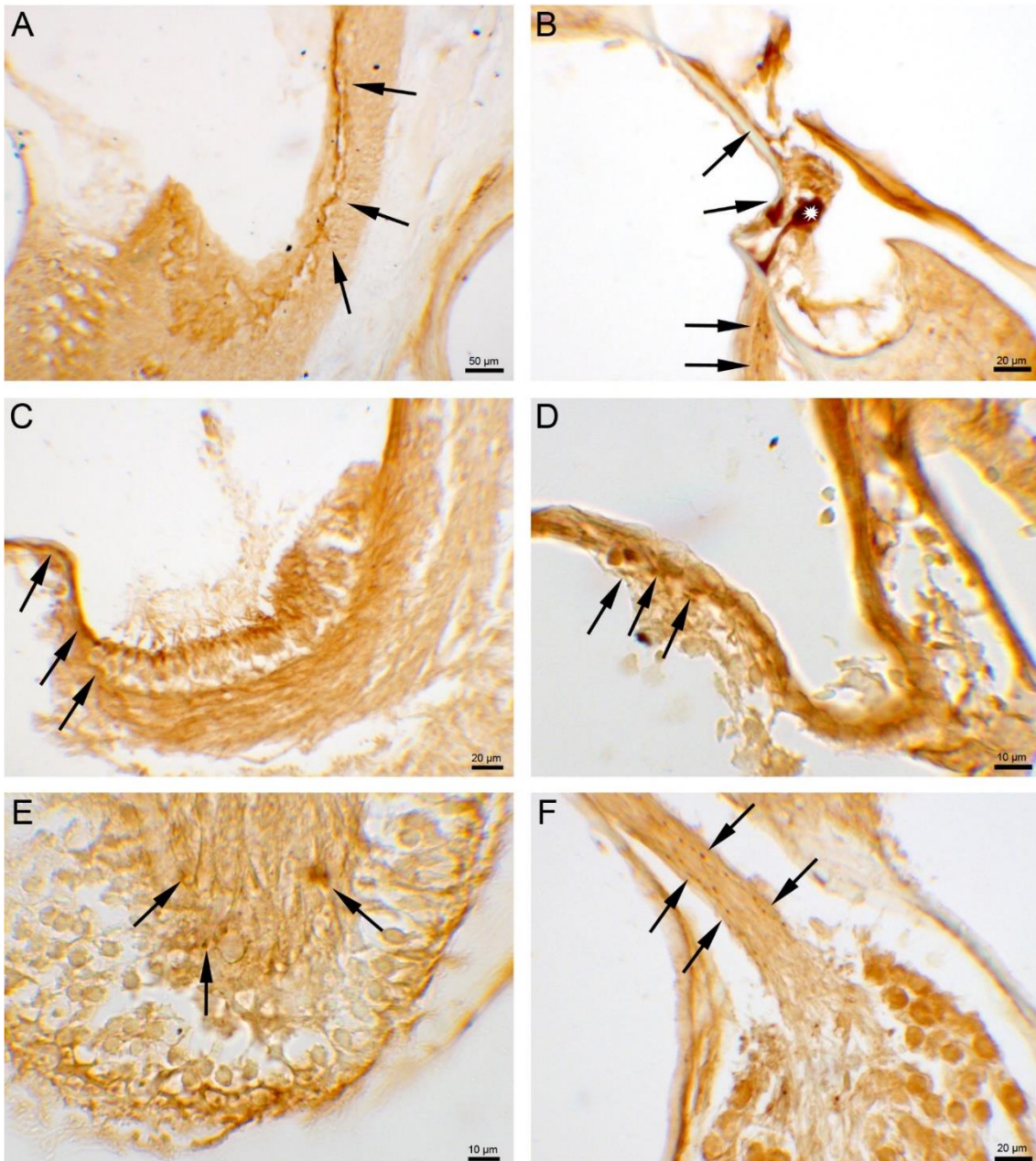


Abbildung 31: Feines Netz aus NPY-ir Elementen in der Stria vascularis (A). Im Corti-Organ ließen sich unterschiedliche Strukturen mit NPY-IR nachweisen (B). NPY-ir Elemente im Bogengang mit afferenten NPY-ir Nervenfasern im Nervus vestibularis (C – E). NPY-ir Nervenfasern zogen vom Corti-Organ zum Ganglion cochleare (F).

**Pfeil:** NPY-ir Nervenfasern  
**weißes Sternchen:** Stützzelle

### 3.1.3 Substanz P

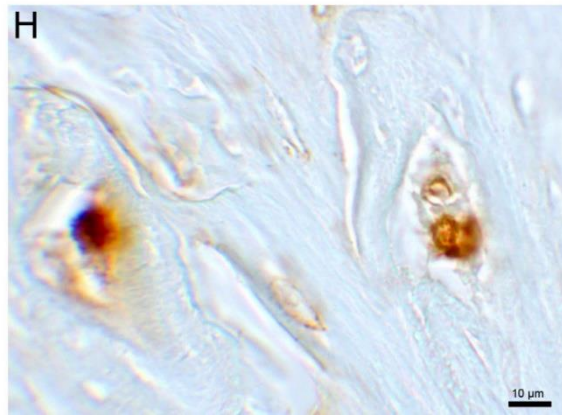
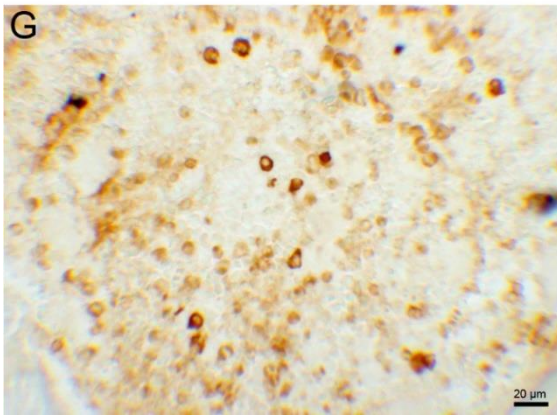
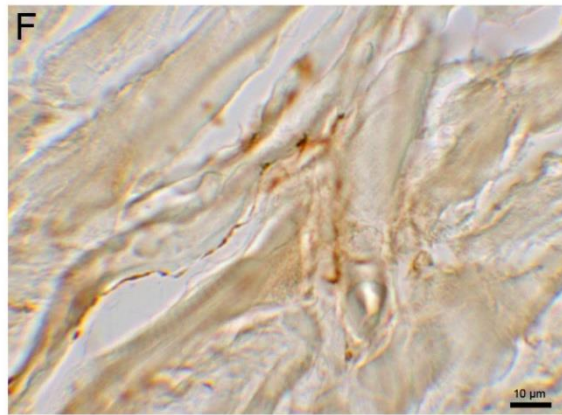
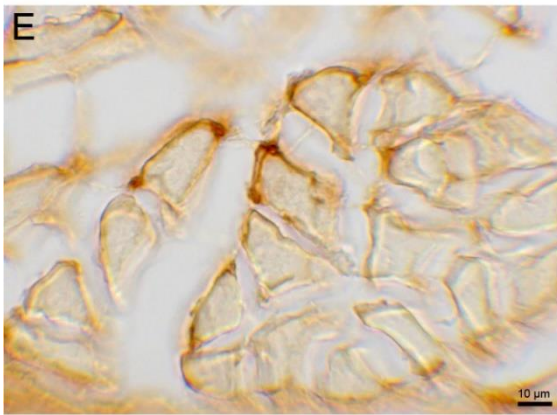
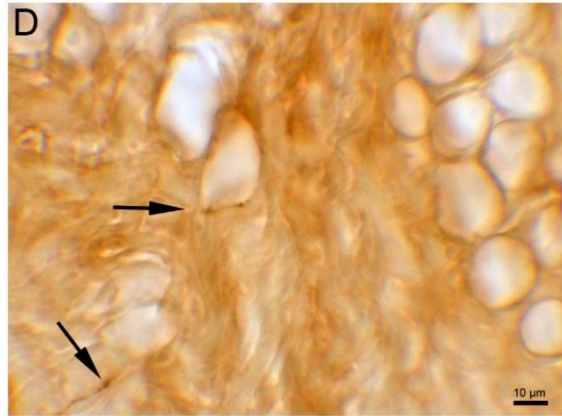
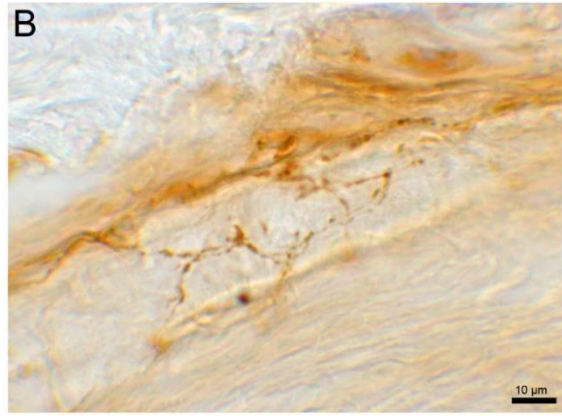
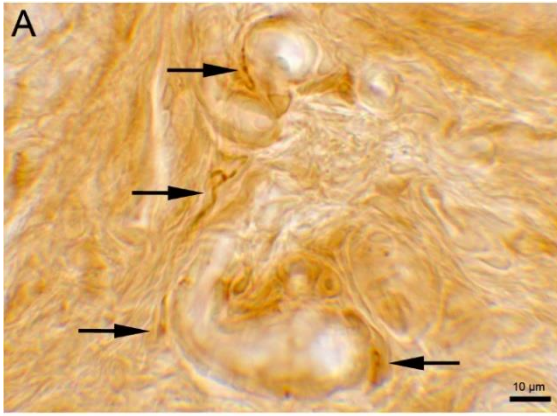
Substanz P (SP) ließ sich nach immunocytochemischer Färbung in einer Vielzahl von Strukturen im und um das Mittelohr nachweisen. Unabhängig vom Gefäßkaliber konnten um die Blutgefäße netzartig komponierte SP-ir Nervenfaserverbände beobachtet werden (Abb. 32A - C). In der Gefäßwand größerer Arterien konnten einzelne SP-ir Faserprofile aufgefunden werden (Abb. 32C).

Im Muskel- und Fettgewebe konnten vereinzelt SP-ir Elemente gefunden werden (Abb. 32D – F). Im Muskel begleiteten SP-ir Fasern zumeist Kapillaren, wogegen im Fettgewebe SP-ir Fasern an Adipozyten endeten.

Im Knochenmark ließen sich aufgrund ihrer hohen Syntheseleistung und der endogenen Peroxidaseaktivität unspezifisch Zellen der Erythropoese anfärben (Abb. 32G). Genauso färbte sich auch das Stratum osteogenicum des Periosts stärker als der Hintergrund. In einigen Haversschen Kanälen, die durch den Knochen ziehen, konnten SP-ir Strukturen gefunden werden (Abb. 32H). Insgesamt war die Häufigkeit von immunreaktiven Elementen in Knochenstrukturen jedoch gering. Der Knorpel der Ohrmuschel war SP-negativ.

*Abbildung 32: Feines Netz aus SP-ir Elementen um Gefäße (A - C). Im Fettgewebe konnten einige SP-ir Fasern gefunden werden (D). Im Muskelquer- und längsanschnitt ließen sich SP-ir Nervenfasern oder einzelne Varikositäten oft in Begleitung von Kapillaren nachweisen (E und F). Im Knochenmark konnten unspezifisch für SP angefärbte Zellen der Erythropoese gefunden werden (G). In den Haversschen Kanälen ließen sich SP-positive Nervenfasern beobachten, die die Gefäße begleiteten (H). S. Seite 99.*

**Pfeil:** SP-ir Nervenfasern

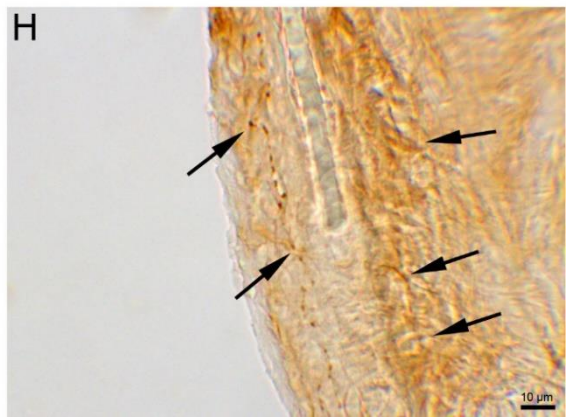
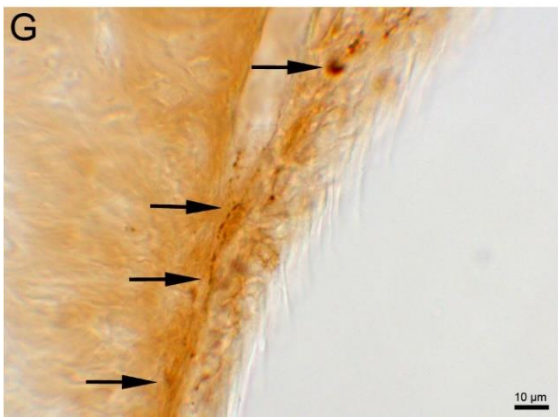
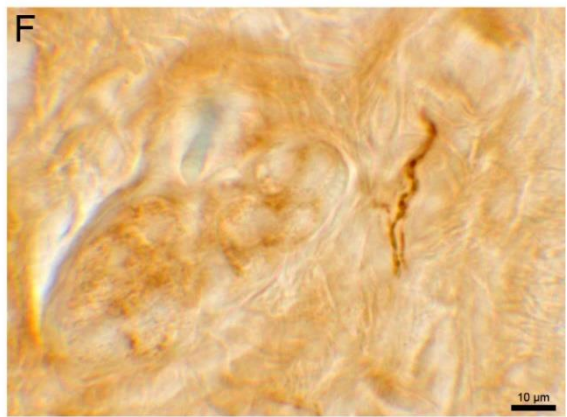
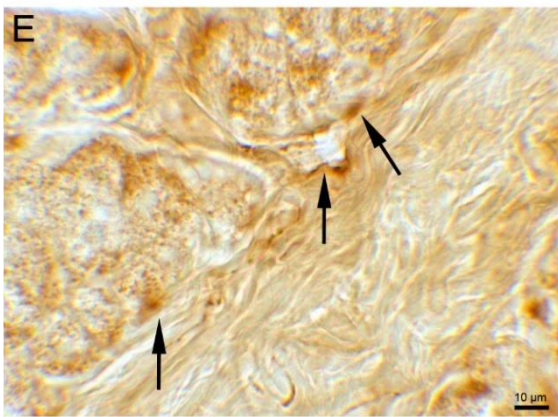
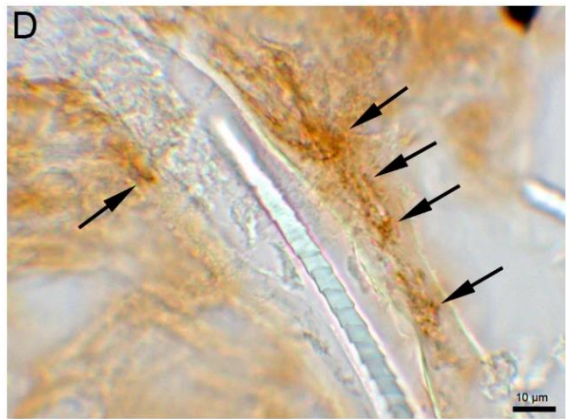
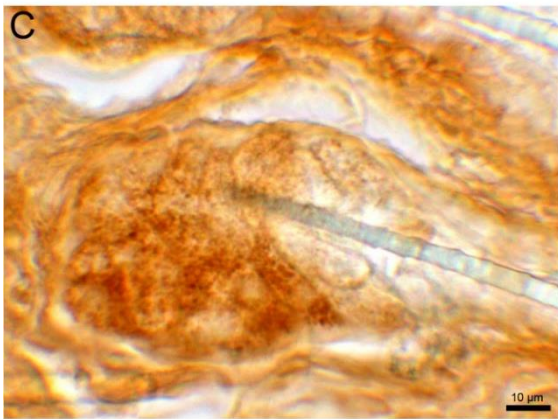
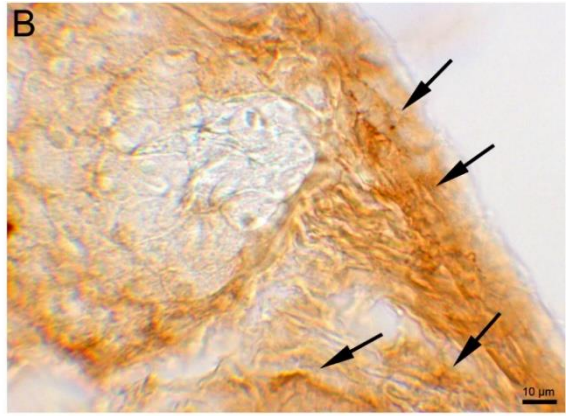
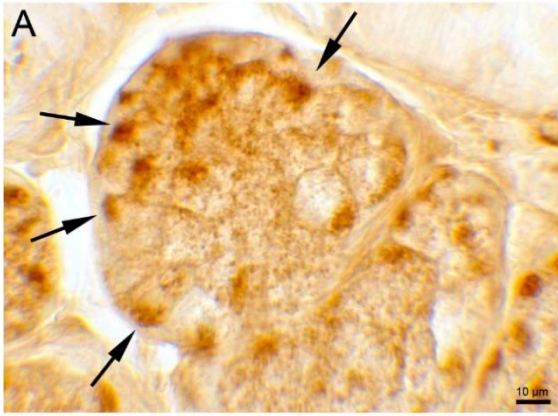


Im Binde- und Stützgewebe, welches den Gehörgang und das Mittelohr umgibt, ließen sich SP-ir Nervenfasern beobachten, die sich teilweise in mehrere Nervenfaserräste verzweigten (Abb. 33E, G). Vor allem im Bereich zwischen den Gll. ceruminiferae des äußeren Gehörgangs waren SP-ir Faserprofile zu verfolgen, die besonders an den apikalen Drüsenpol zogen (Abb. 33B, F). Sowohl in den Gll. ceruminiferae als auch in der Gl. parotidea ließen sich SP-ir Elemente nachweisen. Diese wurden vor allem in den basalen Drüsenzellen und am Rand der Drüsen gefunden (Abb. 33A). Die Talgdrüsen, die in Beziehung zu den Haaren vorkamen, enthielten auch SP-ir Faserprofile (Abb. 33C). Vor allem in Begleitung zum Haarschaft ließen sich diese Profile anfärben (Abb. 33D).

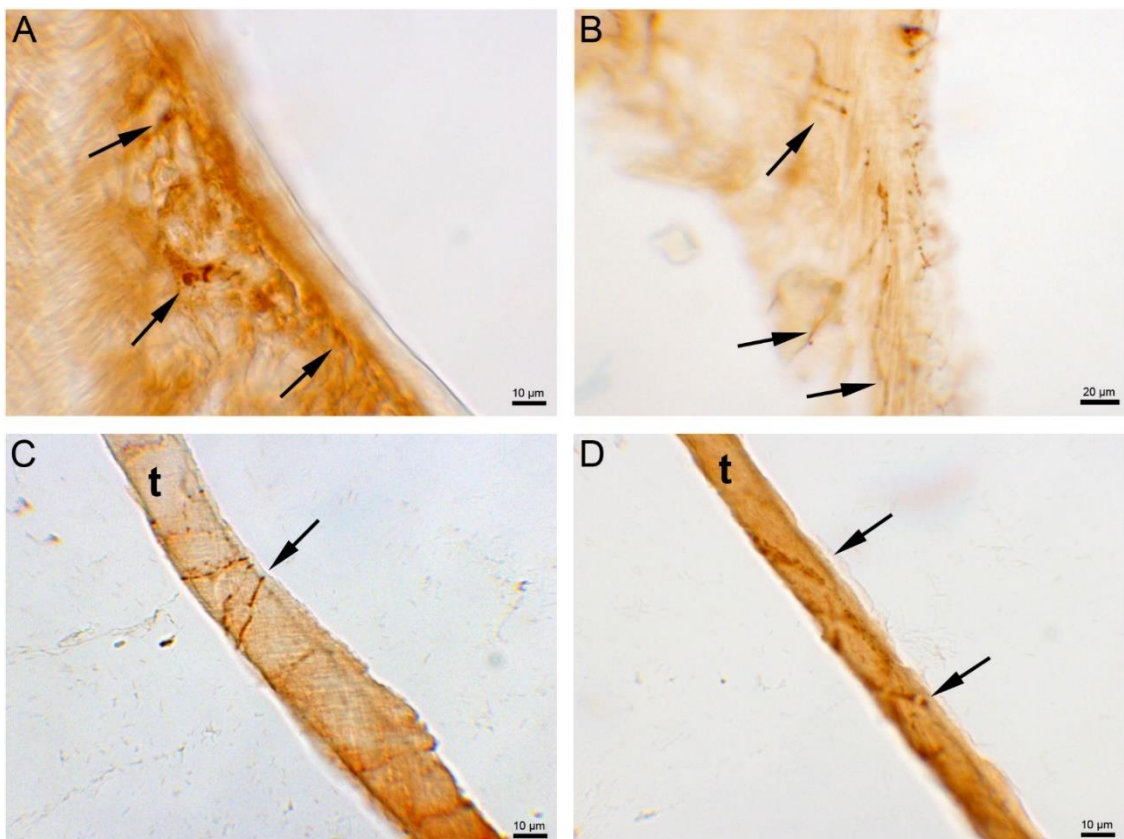
Außerdem war bis in die apikalen Epithelschichten des äußeren Gehörgangs ein feines Geflecht aus SP-ir Elementen zu beobachten (Abb. 33H). Lange Faserprofile ließen sich in den tieferen Schichten finden.

*Abbildung 33: SP-ir Elemente basal an den Drüsenzellen der Glandula parotidea (A). Das umliegende Bindegewebe wurde von SP-ir Nervenfasern durchzogen, welche vor allem apikal zu den Drüsen zogen (B, E, F). Am Haar assoziierte Talgdrüse mit SP-ir Elementen, welche den Haarschaft nach apikal begleiteten (C und D). SP-ir Nervenfasern mit typischen Varikositäten zogen in tiefen Schichten und durch die oberen Epithelzellschichten des äußeren Gehörgangs (G und H). S. Seite 101.*

**Pfeil:** SP-ir Nervenfaser



In den Bereichen, die direkt am anulären Trommelfellansatz lagen, wurden sowohl in der Mittelohrschleimhaut und vor allem auch im äußeren Gehörgang vermehrt SP-ir Elemente gefunden, die ein dichtes Netz bildeten (Abb. 34A). Dieses breitete sich bis ins Trommelfell aus (Abb. 34B). Es konnten SP-ir Nervenfasern identifiziert werden, die dem Trommelfell vor allem in den ansatznahen Bereichen auflagen (Abb. 34C und D).



**Abbildung 34:** *SP-ir Elemente im äußeren Gehörgang in der Nähe des Trommelfellansatzes (A). Feine SP-ir Nervenfasern ziehen vom anulären Ansatz bis ins Trommelfell (B). SP-positive Varikositäten am Trommelfell (C und D).*

**Pfeil:** SP-ir Nervenfaser  
**t:** Trommelfell

Einzelne SP-ir Nervenfasern in Nerven unterschiedlicher Größe ließen sich über alle Präparate hinweg nachweisen (Abb. 35A – D). In den Ganglien waren vereinzelt SP-ir Nervenzellperikaryen lokalisiert (Abb. 35E – F).

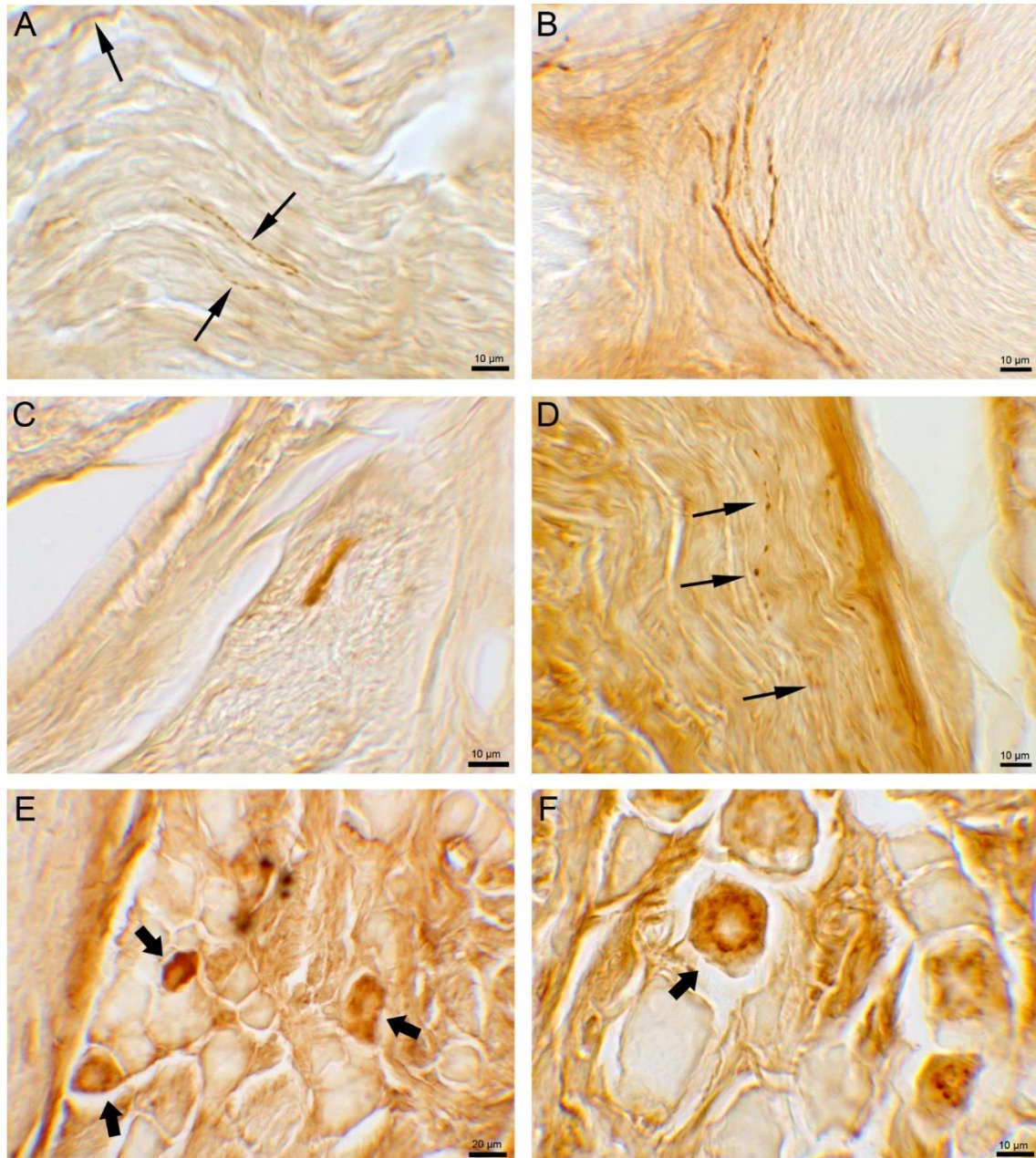


Abbildung 35: Einzelne SP-ir Nervenfasern in Nerven (A – C). SP-ir Ganglienzellen (E und F).

**dicker Pfeil:** SP-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** SP-ir Nervenfasern

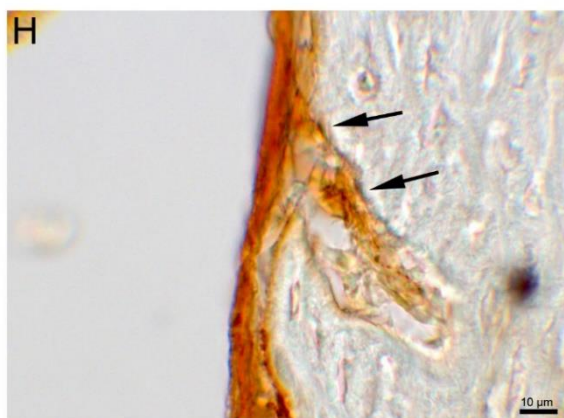
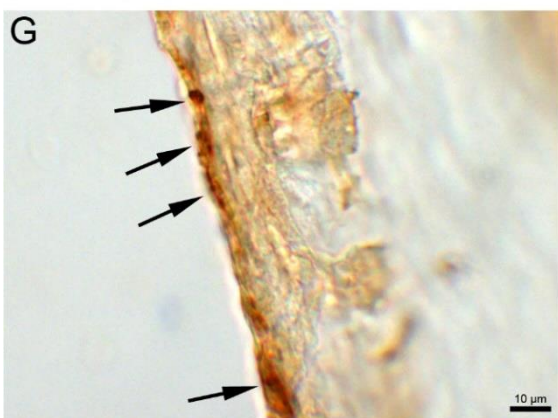
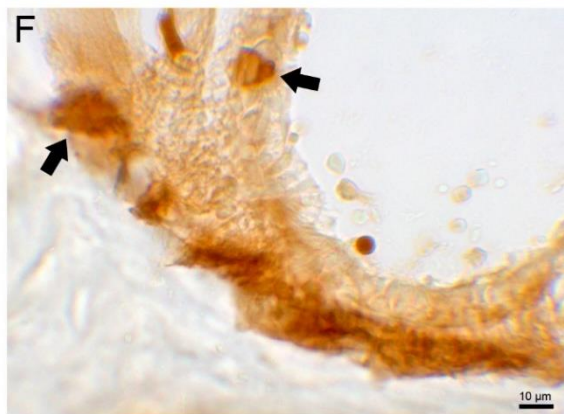
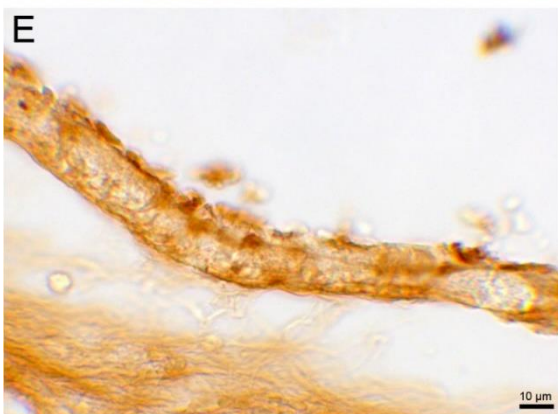
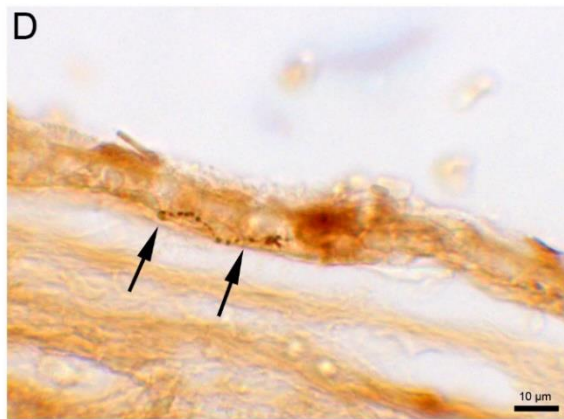
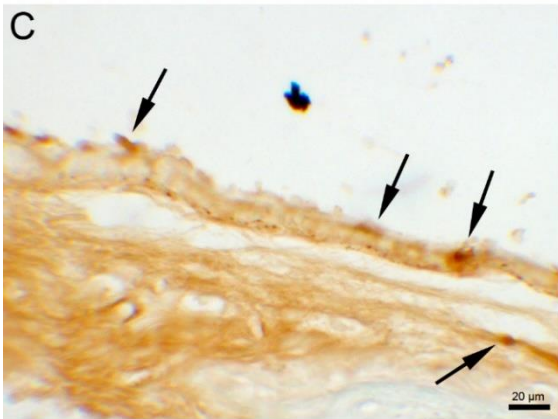
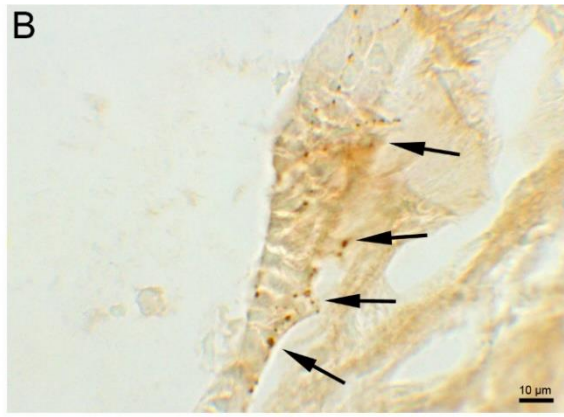
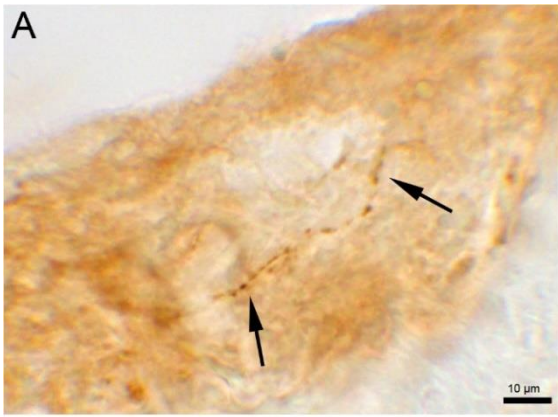
Die Mittelohrschleimhaut zeigte in nahezu allen Bereichen SP-IR (Abb. 36). Auch über längere Strecken konnten *beaded* Nervenfasern mit perlschnurartig aneinander gereihten Boutons gefunden werden (Abb. 36A, B).

An Stellen, an denen die Schleimhaut hoch ausgebildet und etwas aufgelockert war, wie z. B. in direkter Nachbarschaft zum Innenohr, konnten basal am Knochen große SP-ir Elemente und apikal kleinere SP-ir Elemente nachgewiesen werden (Abb. 36C – F). In den gegenüberliegenden Bereichen, in denen die Schleimhaut dünner war, ließen sich einzelne Varikositäten oder kleinere Faserprofile beobachten (Abb. 36G). Durch Knochenkanäle, in denen Blutgefäße lagen, konnten SP-ir Elemente die Cavitas tympani erreichen (Abb. 36H).

*Abbildung 36: Feines Netz aus SP-ir Elementen in der Schleimhaut der Cavitas tympani (A und B). In der hoch aufgebauten Schleimhaut ließen sich apikal SP-positive Elemente nachweisen (C und E). Auch in tieferen Schichten wurden SP-ir Elemente gefunden (D und F). SP-ir Varikositäten in der flachen Schleimhaut (G). Nervenfasern mit SP-IR ziehen durch einen Knochenkanal in die Cavitas tympani (H). S. Seite 105.*

**dicker Pfeil:** SP-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** SP-ir Nervenfasern





In der Schleimhaut, die den Gehörknöchelchen anliegt, befanden sich SP-ir Strukturen. Diese Strukturen ließen sich direkt am Knochen des Steigbügels beobachten (Abb. 37A, B). Um Hammer und Amboss lagen die SP-ir Elemente tiefer in der Schleimhaut und kamen in geringerer Anzahl vor (Abb. 37C, D).

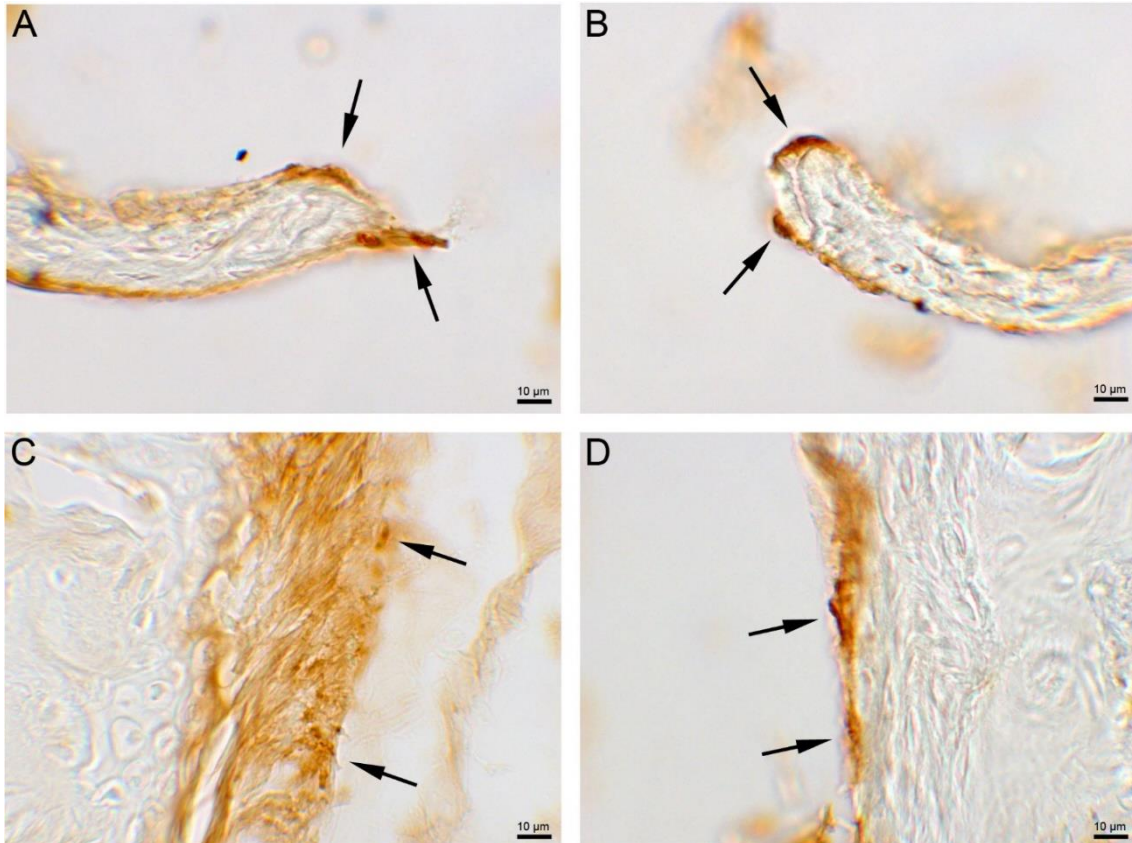
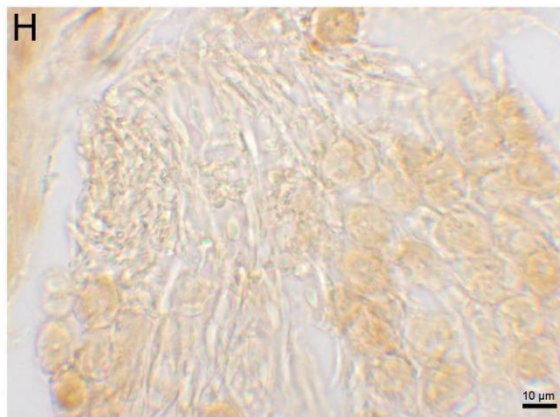
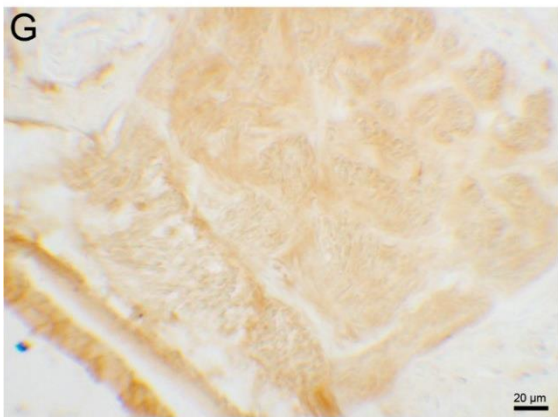
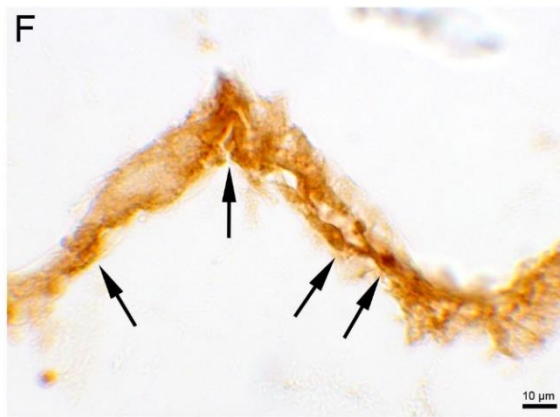
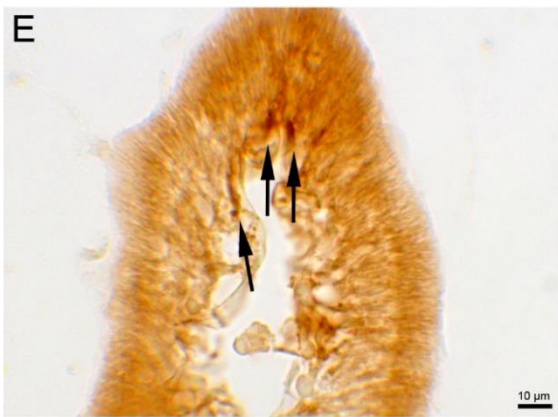
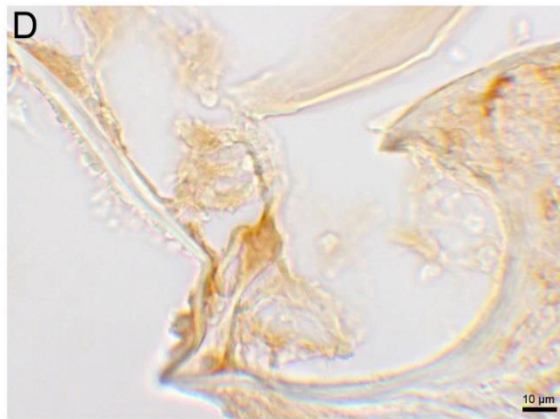
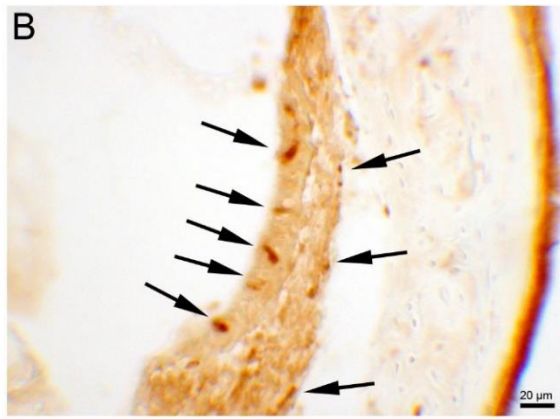
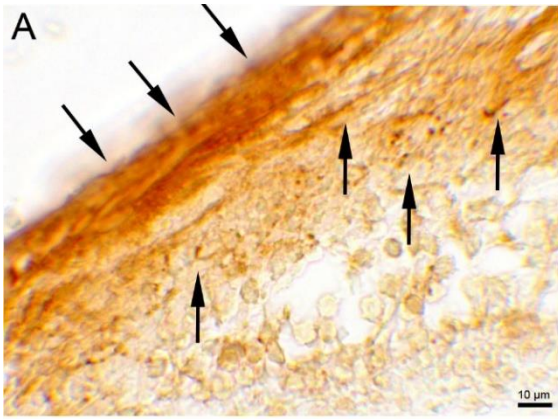


Abbildung 37: SP-ir Elemente am Steigbügel (A und B) und um Hammer und Amboss (C und D).

**Pfeil:** SP-ir Nervenfaser

Abbildung 38: Geflecht aus SP-ir Elementen in der Stria vascularis (A). SP-ir Strukturen konnten in einer charakteristischen Anordnung in der Stria vascularis gefunden werden (B). Im Knochen, der das Innenohr umgibt, konnten zahlreiche SP-ir Nervenfasern verfolgt werden (C). Im Corti-Organ ließen sich keine Strukturen mit SP-IR nachweisen (D). SP-ir Elemente im Bogengang (E und F). Im Nervus vestibularis konnten keine SP-ir Nervenfasern gefunden werden (G). Auch im Nervus cochlearis und im Ganglion cochleare ließen sich keine Fasern oder Zellen mit SP-IR nachweisen (G und H). S. Seite 107.

**Pfeil:** SP-ir Nervenfaser



Im Innenohr und Vestibularapparat ließen sich insgesamt nur wenige Strukturen mit SP-IR erkennen. Es ließen sich jedoch zahlreiche SP-ir Nervenfasern beobachten, die durch den Knochen zum Innenohr bis an die Stria vascularis zu verfolgen waren (Abb. 38C). Auch in der Stria vascularis konnte ein Netz aus SP-ir Elementen aufgefunden werden (Abb. 38A). Diese SP-ir Strukturen waren in einer charakteristischen Weise angeordnet (Abb. 38B). Im Corti-Organ konnten keine Strukturen mit SP-IR nachgewiesen werden (Abb. 38D).

In den Schleimhäuten der Bogengangsampullen waren SP-positive Strukturen beobachtet worden; einzelne dieser Fasern waren basal der Haarzellen auf den Cristae ampullares lokalisiert (Abb. 38E, F).

Beide Anteile des N. vestibulocochlearis enthielten weder Fasern mit SP-IR noch konnten im Ggl. cochleare SP-positive Nervenzellperikaryen gefunden werden (Abb. 38G, H).

### 3.1.4 Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase

Bei der immunocytochemischen Färbung wurde ein Antikörper benutzt, der gegen das Enzym Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) gerichtet war. Dieses Enzym ist kupferhaltig und membrangebunden und katalysiert die Hydroxylierung von Dopamin zu Noradrenalin unter Mitwirkung von Ascorbinsäure. Die Hydroxylierung ist der letzte Schritt in der Synthese von Noradrenalin, des Transmitters der postganglionären Strecke (zweites Neuron) im sympathischen Nervensystem. Immunocytochemisch lassen sich derart noradrenerge oder adrenerge Neurone nachweisen. Von diesen konnten einige im Mittelohr und in angrenzenden Bereichen gefunden werden.

Um zahlreiche Gefäße konnten DBH-ir Fasern nachgewiesen werden (Abb. 39). Dabei ließen sich DBH-ir Varikositäten in den Gefäßwänden finden. Zudem konnten vor allem in der Adventitia der Gefäße vermehrt Strukturen mit DBH-IR beobachtet werden. Diese Fasern wiesen Verbindungen in die Gefäßwände auf (Abb. 39A). Die Wand der Äste der A. carotis externa, die in die Cavitas tympani ziehen, ist von vielen DBH-ir Nervenfasern umgeben (Abb. 39E, F). Im Muskelgewebe ließen sich DBH-ir Nervenfasern nachweisen, die sich um eine Kapillare gewunden haben.

Auch in den Havers- und Volkmannkanälen ließen sich begleitend zu den Kapillaren DBH-ir Nervenfasern finden, die auf diese Art durch den Knochen zogen und so z. B. mit der Schleimhaut des Mittelohrs in Verbindung standen (Abb. 39D).

Im Knochenmark konnten Zellen angefärbt werden, die sich in ihrer Intensität stark von der Hintergrundfärbung abgehoben haben. Dabei handelt es sich am ehesten um eine Anfärbung aufgrund der hohen Peroxidaseaktivität und damit um eine unspezifische Tingierung.

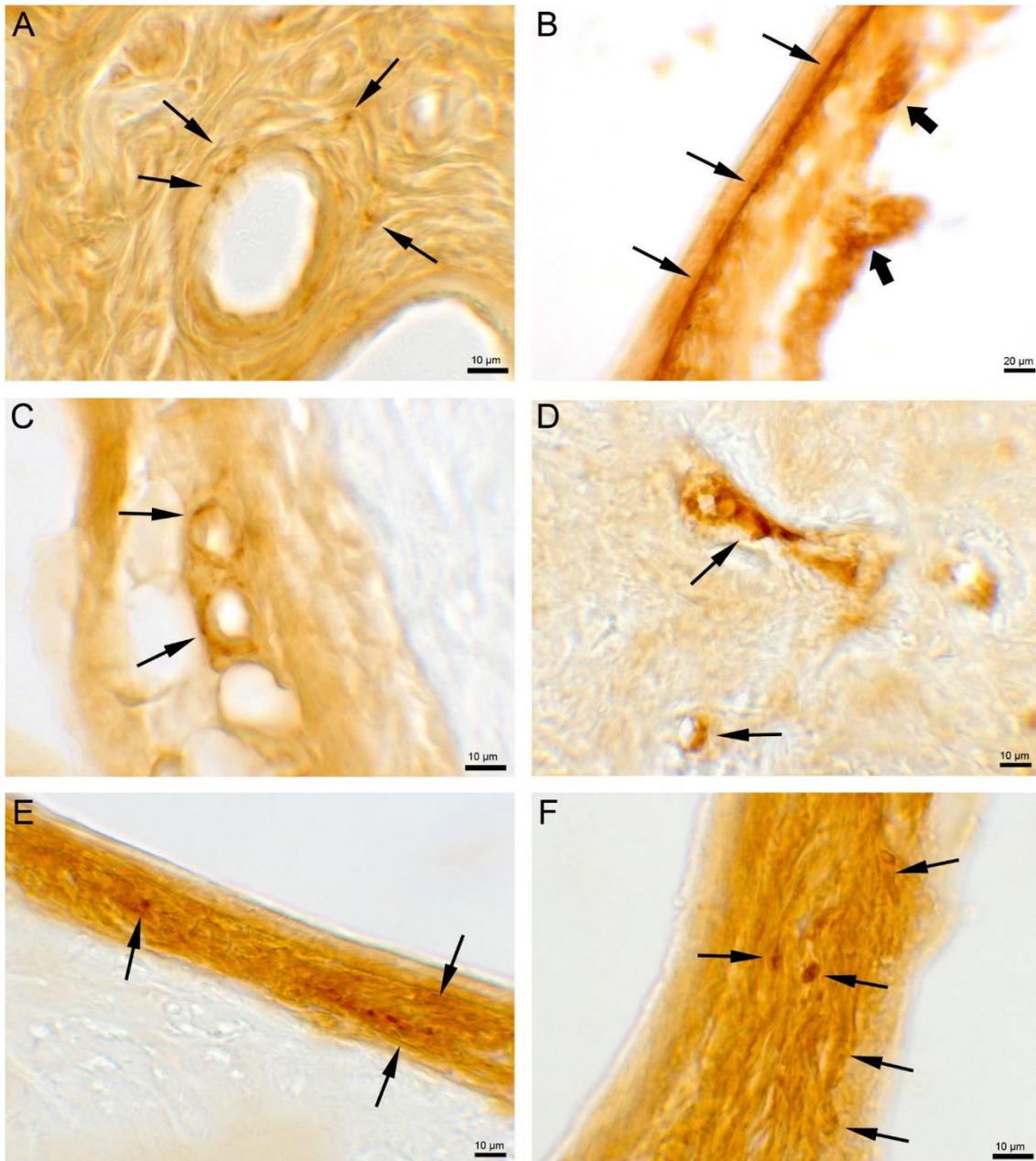
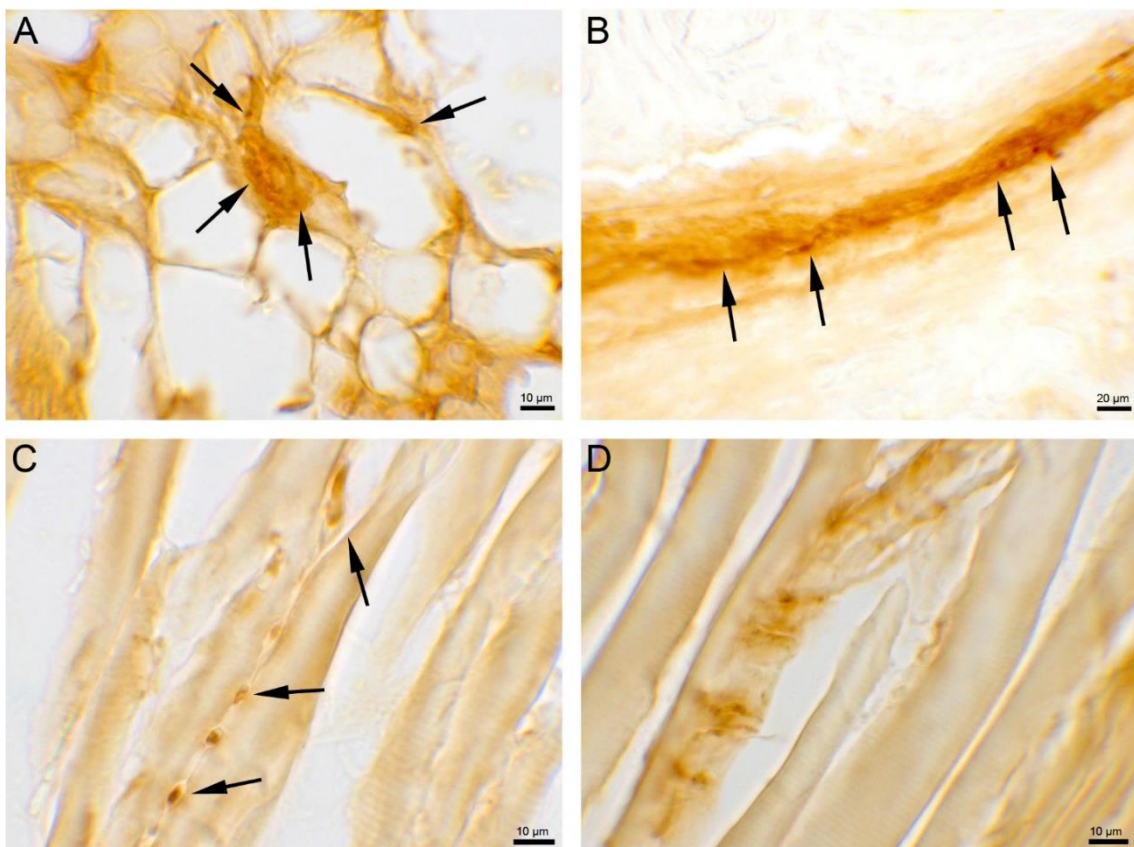


Abbildung 39: DBH-ir Elemente um eine Arteriolenwand. Gut zu erkennen waren die zuführenden DBH-ir Nervenfasern im Mittelohrbereich der Ratte (A). DBH-ir Elemente um die Wand eines großen Gefäßes (B) und um Kapillaren (C). Gefäße in Haversschen Kanälen wurden von DBH-ir Fasern begleitet (D). Gefäßwand mit Varikositäten (E und F).

**dicker Pfeil:** DBH-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** DBH-ir Nervenfasern

Im umliegenden Binde- und Fettgewebe ließen sich einzelne Varikositäten und Fasern nachweisen, die zwischen den Fettzellen und den Bindegewebsfasern entlang zogen (Abb. 40A, B). Vereinzelt ließen sich auch DBH-ir Zellen im Gewebe beobachten (Abb. 41E, F).

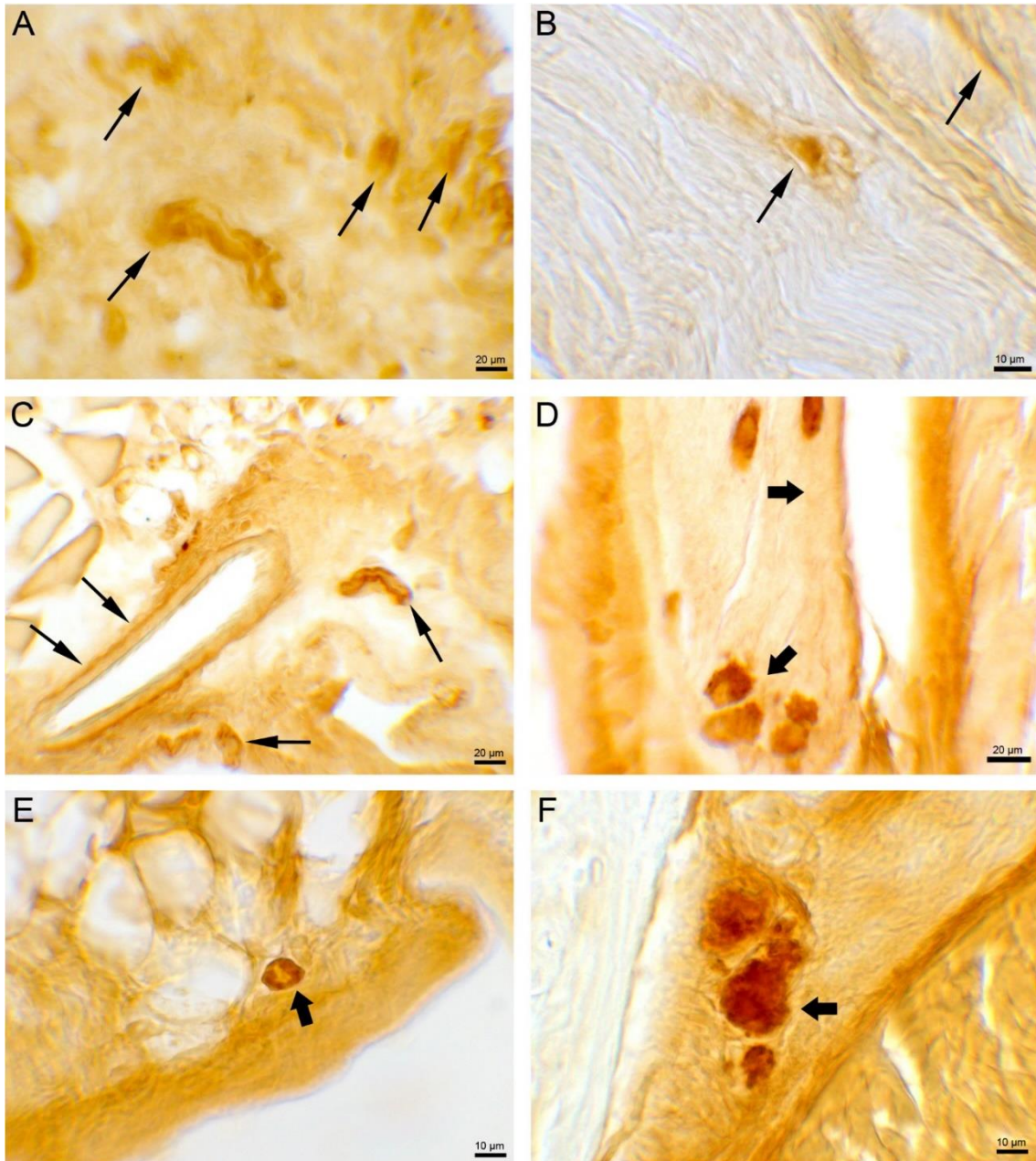
Im Muskel konnten aneinander gereihte Varikositäten mit DBH-IR beobachtet werden (Abb. 40C). Diese waren entweder isoliert zwischen den Muskelfasern oder mit Kapillaren im Muskel assoziiert (Abb. 40D).



**Abbildung 40:** *DBH-ir Nervenfasern zwischen den Fettzellen (A). DBH-ir Nervenfasern im Bindegewebe, welches in einer Knochenspalte liegt (B). DBH-ir Varikositäten zwischen Muskelfasern (C). DBH-ir Nervenfasern, die sich um eine Kapillare in der Muskulatur gewunden haben (D).*

**Pfeil:** *DBH-ir Nervenfasern*

Kleine Nerven, die sich im Gewebe verfolgen ließen, zeigten DBH-IR (Abb. 41A). Innerhalb der großen Nerven ließen sich einzelne DBH-ir Nervenfasern identifizieren (Abb. 41B). In den Ganglien ließen sich einige DBH-ir Nervenzellperikaryen nachweisen (Abb. 41D).



**Abbildung 41:** DBH-ir Nervenfasern durchzogen das Gewebe (A). Einzelne DBH-ir Nervenfasern in einem Nerv (B). DBH-IR um ein Gefäß, im Nerv und im umliegenden Binde- und Stützgewebe (C). DBH-ir Nervenzellperikaryen in einem Ganglion (D). DBH-ir Zelle isoliert im Gewebe (E). DBH-ir Strukturen im Bindegewebe (F).

**dicker Pfeil:** DBH-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** DBH-ir Nervenfasern



Am basalen Drüsenpol der Gl. parotidea konnten DBH-ir Elemente nachgewiesen werden (Abb. 42A). Außerdem ließen sich Nervenfasern mit DBH-IR identifizieren, die basal an die Drüse heranzogen. In und um die Drüsenzellen der Gl. ceruminiferae im äußeren Gehörgang war die Färbung weniger eindeutig einzuordnen, aber auch hier waren zwischen den Drüsen reichlich DBH-ir Nervenfasern lokalisiert (Abb. 42B).

Im äußeren Gehörgang fanden sich DBH-ir Elemente subepithelial, aber auch in den tiefen Gewebeschichten direkt über dem Knochen (Abb. 42C). Von dort konnten Faserverläufe bis an die Drüsen hinein verfolgt werden (Abb. 42D).

Im Bereich, an dem das Trommelfell ansetzt, verdichteten sich die DBH-ir Fasern zu einem dichten Geflecht (Abb. 42E, F). Feine DBH-Elemente zogen noch bis an den Rand des Trommelfells. Vereinzelt konnten Varikositäten im äußeren Bereich des Trommelfells aufgefunden werden (Abb. 42G, H).

In der Schleimhaut der Cavitas tympani ließen sich je nach Lokalisation unterschiedlich viele DBH-positive Elemente auffinden (Abb. 43). Auch hier verdichteten sie sich in ein Netz in der Nähe des Trommelfells (Abb. 42E). Außerdem war der Bereich über der Cochlea mit einer besonders hohen Schleimhaut versehen, in der sich sowohl Nervenfasern als auch Perikaryen mit DBH-IR nachweisen lassen konnten (Abb. 43C, D). Diese befanden sich basal am Knochen und zogen durch die Schleimhaut. Apikal konnten vereinzelt DBH-ir Zellkörper beobachtet werden (Abb. 43E). In benachbarter Lokalisation konnte eine kleine ganglienartige Ansammlung mit DBH-IR nachgewiesen werden (Abb. 43F). In den Bereichen, in denen die Schleimhaut nur sehr dünn war, ließen sich vor allem Varikositäten finden, die apikal gehäuft waren (Abb. 43A). Am und im Knochen ließen sich DBH-ir Nervenfasern beobachten, die dem Verlauf der intraossealen Gefäße folgten.

*Abbildung 42: DBH-ir Nervenfasern befanden sich basal an die Drüsen (A). DBH-ir Nervenfasern zwischen den Haarwurzeldrüsen im äußeren Gehörgang (B). DBH-ir Varikositäten basal des Epithels des äußeren Gehörgangs (C). Aus tiefen Gewebeschichten des äußeren Gehörgangs zogen DBH-ir Nervenfasern nach apikal bis in den Drüsenbereich. Dort endeten sie am basalen Drüsenpol (D). Am Ansatz des Trommelfells verdichteten sich die DBH-ir Elemente zu einem Netz: sowohl in der Schleimhaut des Mittelohrs (E), aber vor allem auf der dem Gehörgang zugewandten Seite (F). DBH-ir Varikositäten gehäuft am Rand des Trommelfells (G) oder solitäre DBH-ir Varikositäten am Trommelfell (H). S. Seite 115.*

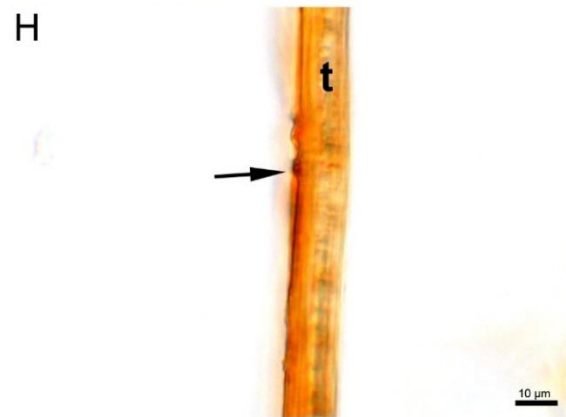
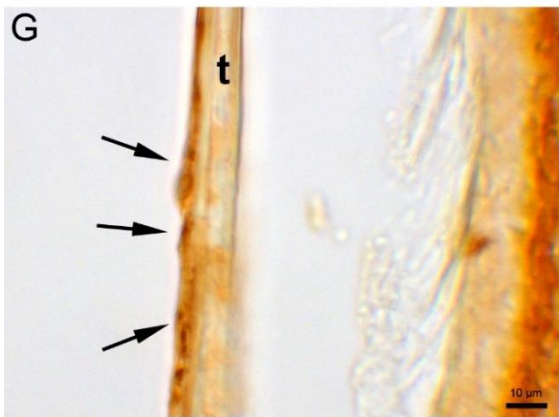
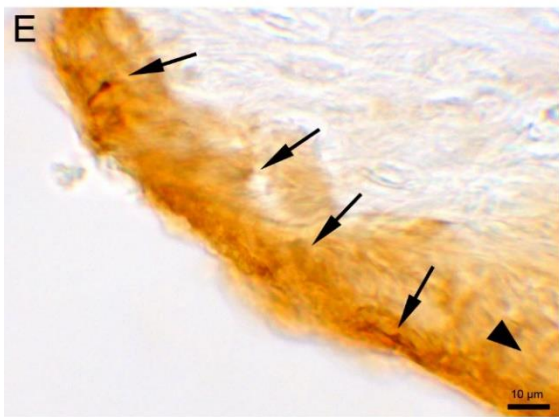
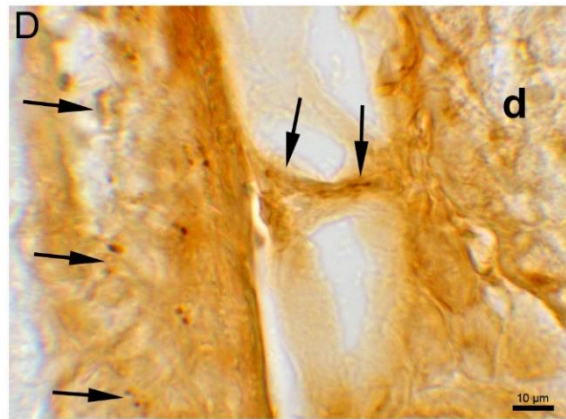
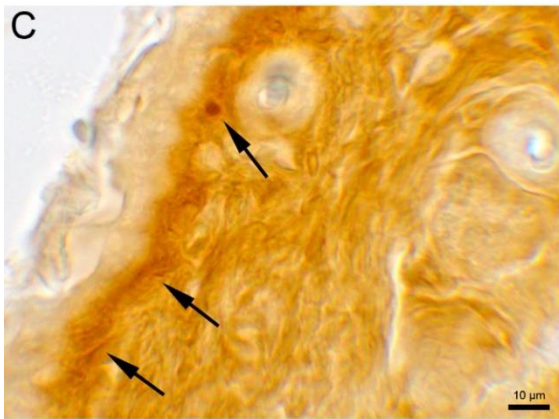
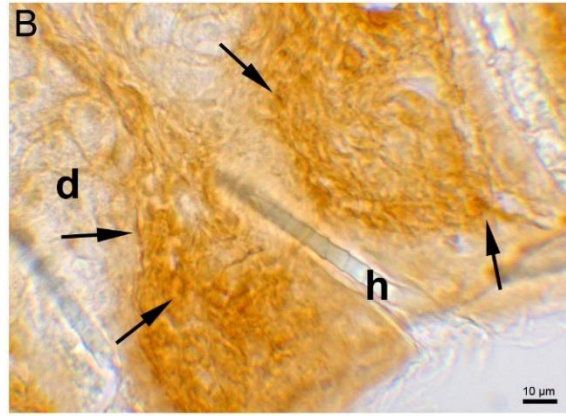
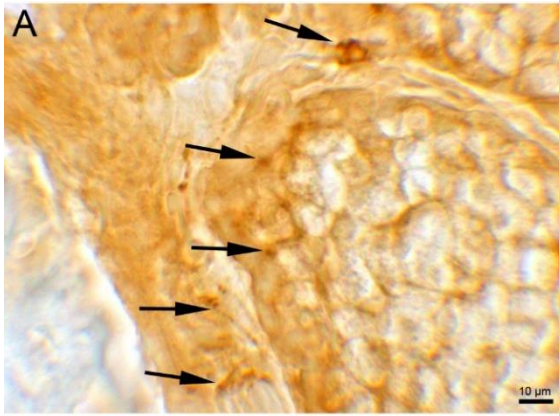
**dünner Pfeil:** DBH-ir Nervenfasern

**Pfeilspitze:** Richtung Trommelfell

**d:** Haarwurzeldrüse

**h:** Haar

**t:** Trommelfell



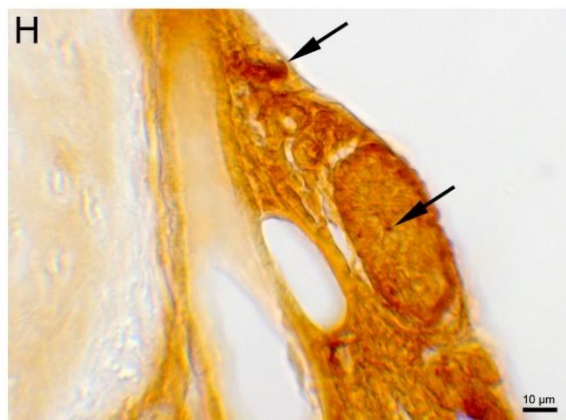
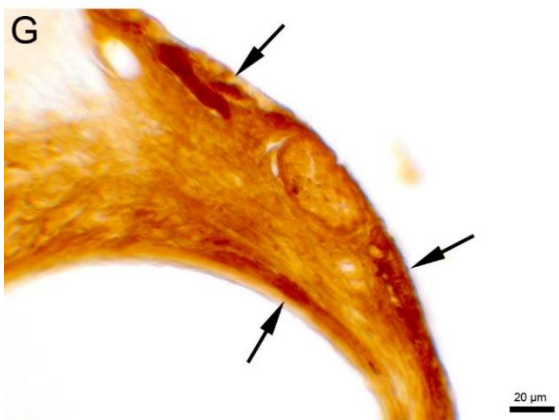
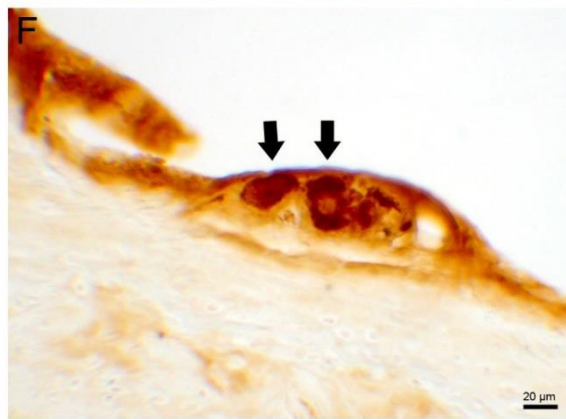
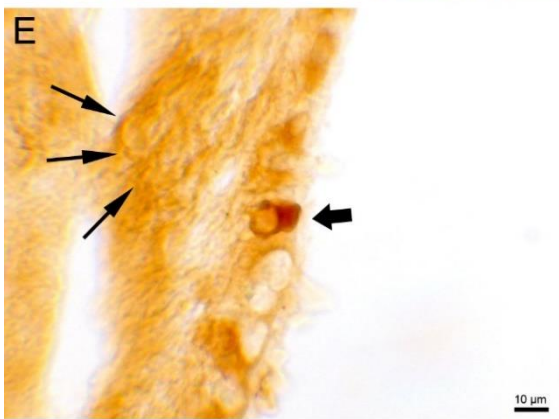
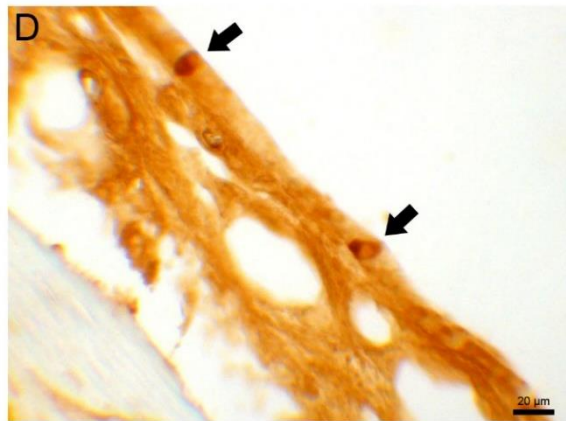
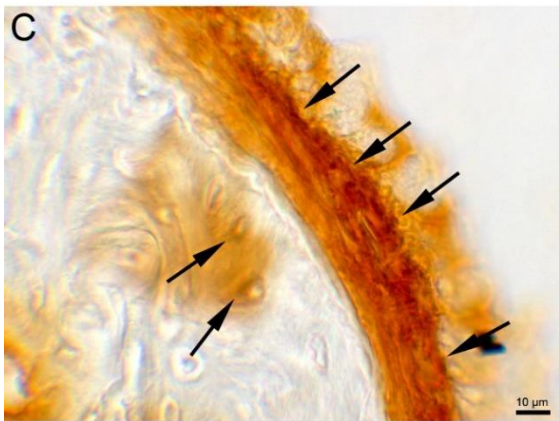
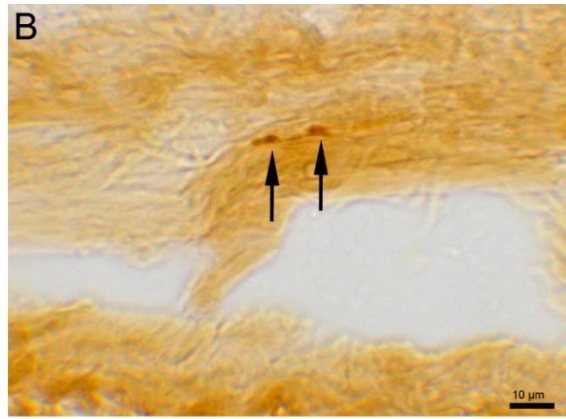
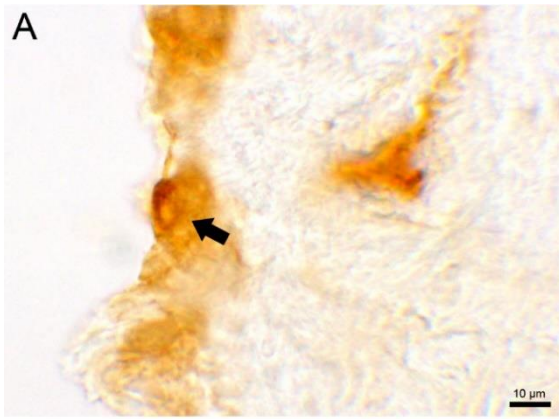
Um alle Gehörknöchelchen befanden sich DBH-ir Nervenfasern. Um den Steigbügel kamen diese in hoher Anzahl sowohl in der Schleimhaut als auch direkt auf dem Knochen vor (Abb. 44A, B). Um Hammer und Amboss ließen sich weniger DBH-ir Strukturen erkennen (Abb. 44D). Am Amboss ließen sich DBH-positive Elemente finden, die direkt dem Knochen auflagen (Abb. 44C).

Im Innenohr- und Vestibularapparat konnte DBH-IR in unterschiedlichen Strukturen nachgewiesen werden. Im umliegenden Knochen ließen sich DBH-positive Nervenfasern finden, die bis zum Innenohr verfolgt werden konnten (Abb. 45A). In der Stria vascularis konnten in allen Bereichen DBH-ir Elemente beobachtet werden, die sich teilweise in einer charakteristischen Anordnung finden ließen (Abb. 45B). Im Corti-Organ ließen sich lediglich Stützzellen anfärben, wobei es sich dort am ehesten um eine unspezifische Anfärbung handelte (Abb. 45C). In den Nervenfasern des N. cochlearis ließen sich Nervenfasern mit typischen Varikositäten nachweisen (Abb. 45D). Im Ggl. cochleare konnten keine DBH-ir Nervenzellperikaryen gefunden werden (Abb. 45E).

In den Bogengangampullen ließen sich DBH-ir Nervenfasern nachweisen (Abb. 45F - H). Im N. vestibularis gab es keine Nervenfasern mit DBH-IR (Abb. 45F).

*Abbildung 43: DBH-ir Zelle in der Mittelohrschleimhaut (A). In tieferen Schleimhautanteilen fanden sich DBH-ir Nervenfaserverläufe mit Boutons (B). DBH-ir Nervenfasern im basalen Anteil der Schleimhaut (C). Apikal gelegene DBH-ir Zellen an der Wand zum Innenohr. In den tieferen Schichten ließen sich DBH-positive Nervenfaserverläufe finden (D und E). Kleine Ansammlung von Ganglienzellen mit DBH-IR (F). DBH-ir Elemente in unmittelbarer Nähe zu einem Gefäßast der A. carotis externa. Auch im Nerv, der das Gefäß begleitet, ließen sich DBH-ir Nervenfasern nachweisen (G und H). S. Seite 117.*

**dicker Pfeil:** DBH-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** DBH-ir Nervenfasern



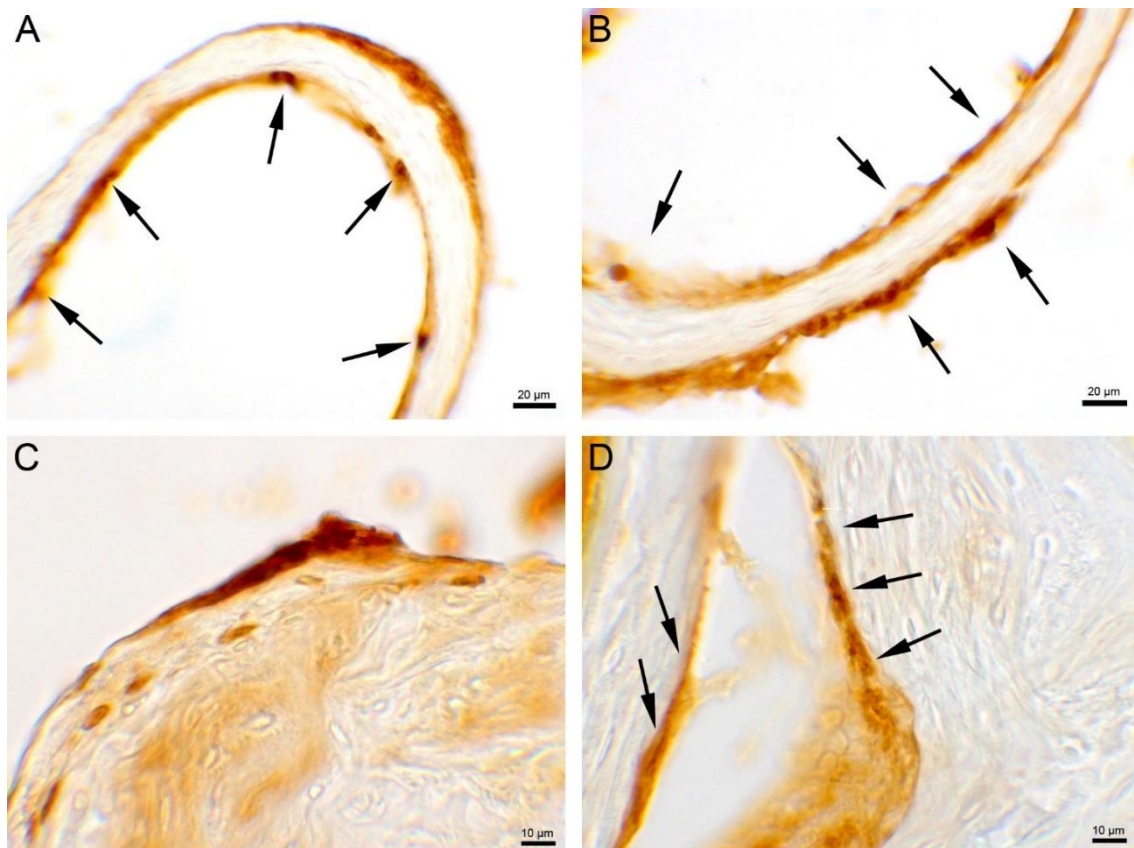
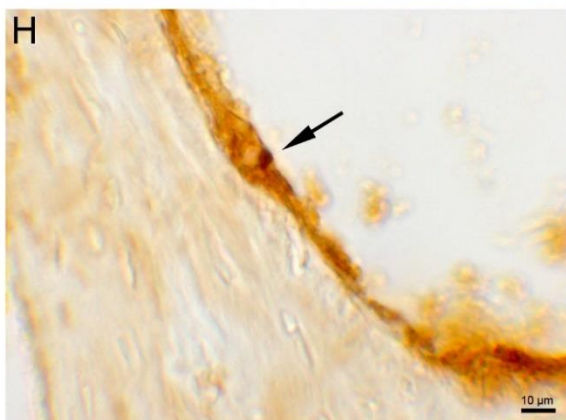
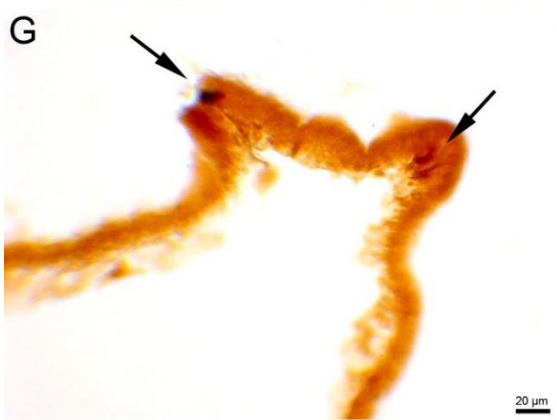
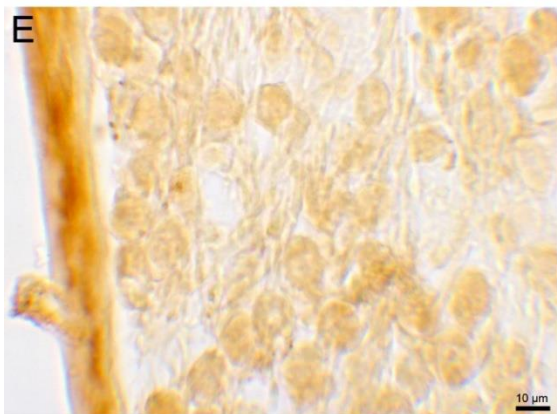
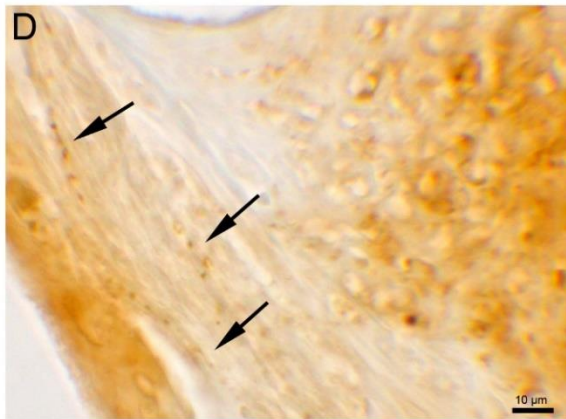
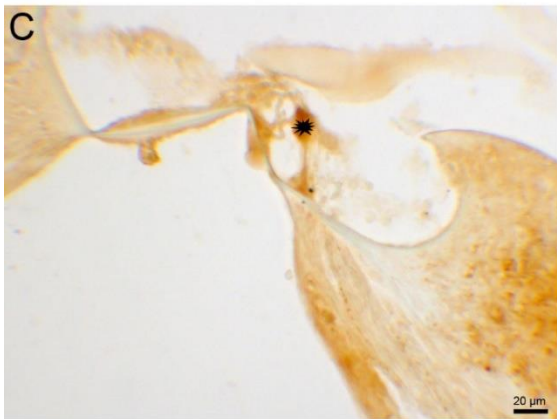
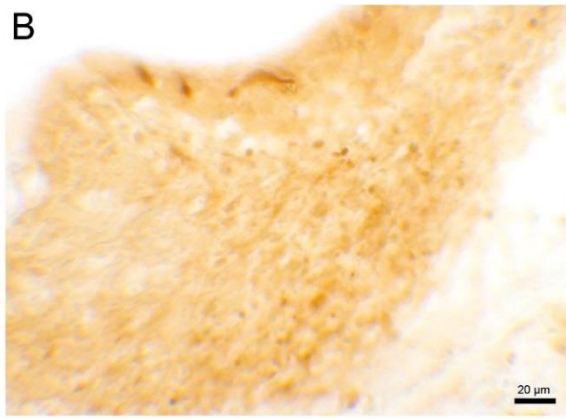
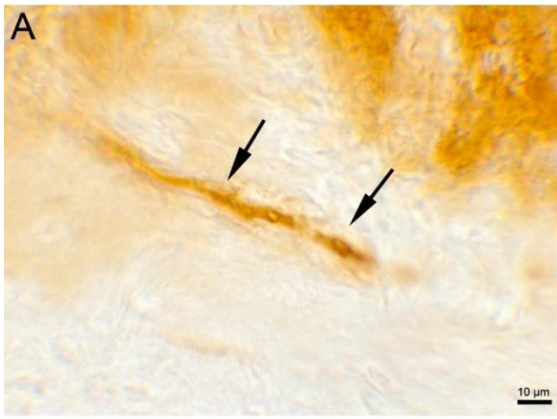


Abbildung 44: DBH-ir Nervenfaserverknotungen um den Steigbügel (A und B). Am Amboss befinden sich apikal sowie auch basal direkt auf dem Knochen DBH-ir (C). In der Schleimhaut, die Hammer und Amboss umgibt, ließen sich DBH-ir Nervenfasern nachweisen (D).

**dünnere Pfeil:** DBH-ir Nervenfasern

Abbildung 45: Es ließen sich DBH-ir Nervenfasern nachweisen, die durch den Knochen zum Innenohrbereich zogen (A). DBH-ir Elemente in der Stria vascularis; teilweise in einer charakteristischen Anordnung (B). Im Corti-Organ gab es keine spezifische Anreicherung, lediglich die Stützzellen waren unspezifisch tingiert (C). Im N. cochlearis ließen sich einzelne DBH-ir Nervenfasern identifizieren (D). Im Ganglion cochleare gab es keine DBH-ir positiven Nervenzellperikaryen (E). In den Bogengangampullen konnten Strukturen mit DBH-IR aufgefunden werden (F, G, H). Im N. vestibularis wurden keine Nervenfasern mit DBH-IR gefunden (F). S. Seite 119.

**dicker Pfeil:** DBH-ir Perikaryen  
**dünnere Pfeil:** DBH-ir Nervenfasern  
**nv:** Nervus vestibularis  
**Sternchen:** Stützzelle



### 3.1.5 Cholin-Acetyl-Transferase

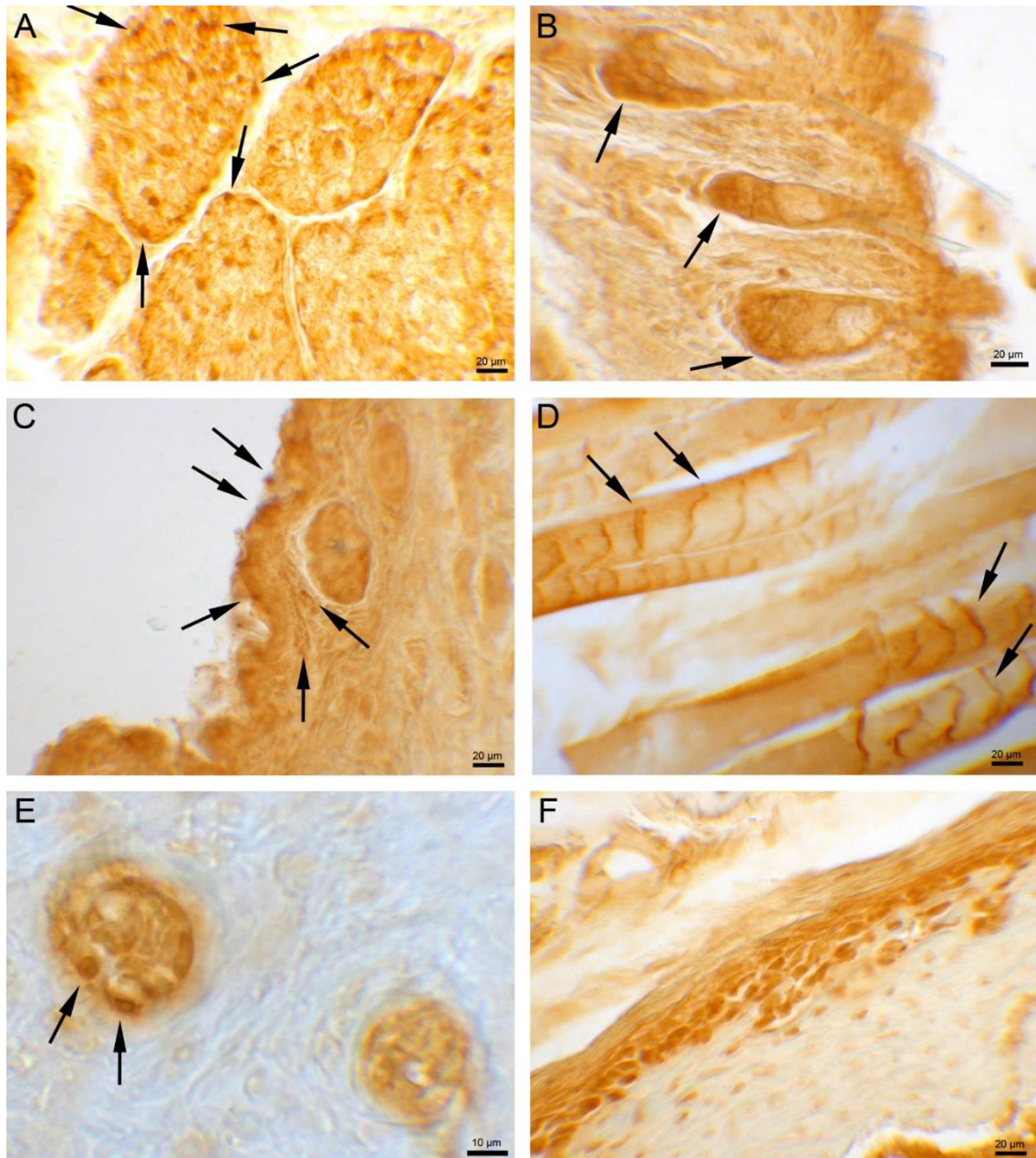
Zum Nachweis cholinergischer Nervenzellen wurde für die Immunocytochemie ein primärer Antikörper gewählt, der gegen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) gerichtet war. Dieses cytosolische und membrangebundene Enzym katalysiert die Bildung von Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA. Es werden also Zellelemente spezifisch angefärbt, die Acetylcholin, den Neurotransmitter der Somatoefferenzen, der präganglionären Strecke von Sympathikus und Parasympathikus und der postganglionären Strecke im parasympathischen Nervensystem, synthetisieren. Es konnten zahlreiche Strukturen mit ChAT-IR im Mittelohr und in angrenzenden Bereichen gefunden werden.

In der Gl. parotidea, die in unmittelbarer Nähe zum äußeren Gehörgang liegt, ließen sich vor allem basal an den Drüsenzellen ChAT-ir Elemente finden (Abb. 46A). Auch in den Talgdrüsen, die an den Haaren im äußeren Gehörgang lokalisiert waren, konnte ChAT-IR nachgewiesen werden (Abb. 46B). In der Schleimhaut und den submukösen Schichten im äußeren Gehörgang konnten feine ChAT-ir Nervenfaserszüge mit einzelnen Varikositäten beobachtet werden (Abb. 46C). An den Verdickungen beim Trommelfellansatz verdichteten sich die ChAT-ir Strukturen ein wenig. Das Trommelfell war jedoch ChAT-negativ.

Im Muskel konnten an den motorischen Endplatten ChAT-ir Elemente gefunden werden (Abb. 46D).

Neben der Hintergrundfärbung wurden im Binde- und Stützgewebe einige Strukturen identifiziert, die intensiver gefärbt waren. In den Havers- und Volkmannkanälen ließen sich gefäßbegleitende Strukturen mit ChAT-IR nachweisen (Abb. 46E). Und im Knochenmark und im Stratum osteogenicum des Periosts ließen sich die Zellen aufgrund ihrer generell hohen Syntheseleistung unspezifisch anfärben (Abb. 46F).



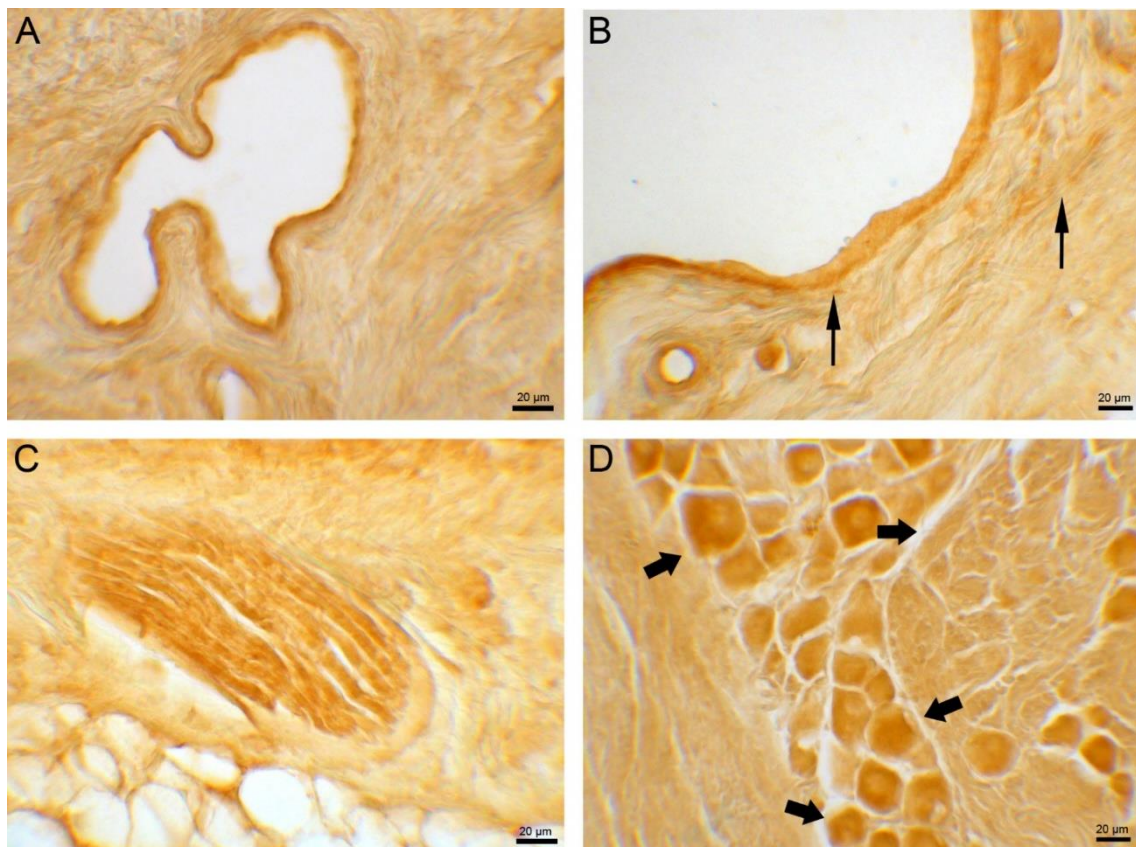


**Abbildung 46:** *Es ließen sich ChAT-ir Elemente an den basalen Anteilen der Drüsenzellen der Glandula parotidea nachweisen (A). ChAT-ir Elemente in den Talgdrüsen an den Haaren im äußeren Gehörgang (B). ChAT-ir Elemente epithelial und subepithelial im äußeren Gehörgang. Vermehrt vor allem um die Drüsenzellen (C). An den motorischen Endplatten im Muskel konnte ChAT-IR nachgewiesen werden (D). Die Kapillare in den Havers- und Volkmannkanälen im Knochen begleitende Fasern mit ChAT-IR (E). Unspezifische Tingierung des Periosts. Im Bindegewebe hingegen ChAT-ir Elemente (F).*

**dünner Pfeil:** ChAT-ir Nervenfasern

Das Endothel der Gefäße zeigte ChAT-IR und in den subendothelialen Schichten ließen sich ChAT-ir Varikositäten finden (Abb. 47A, B).

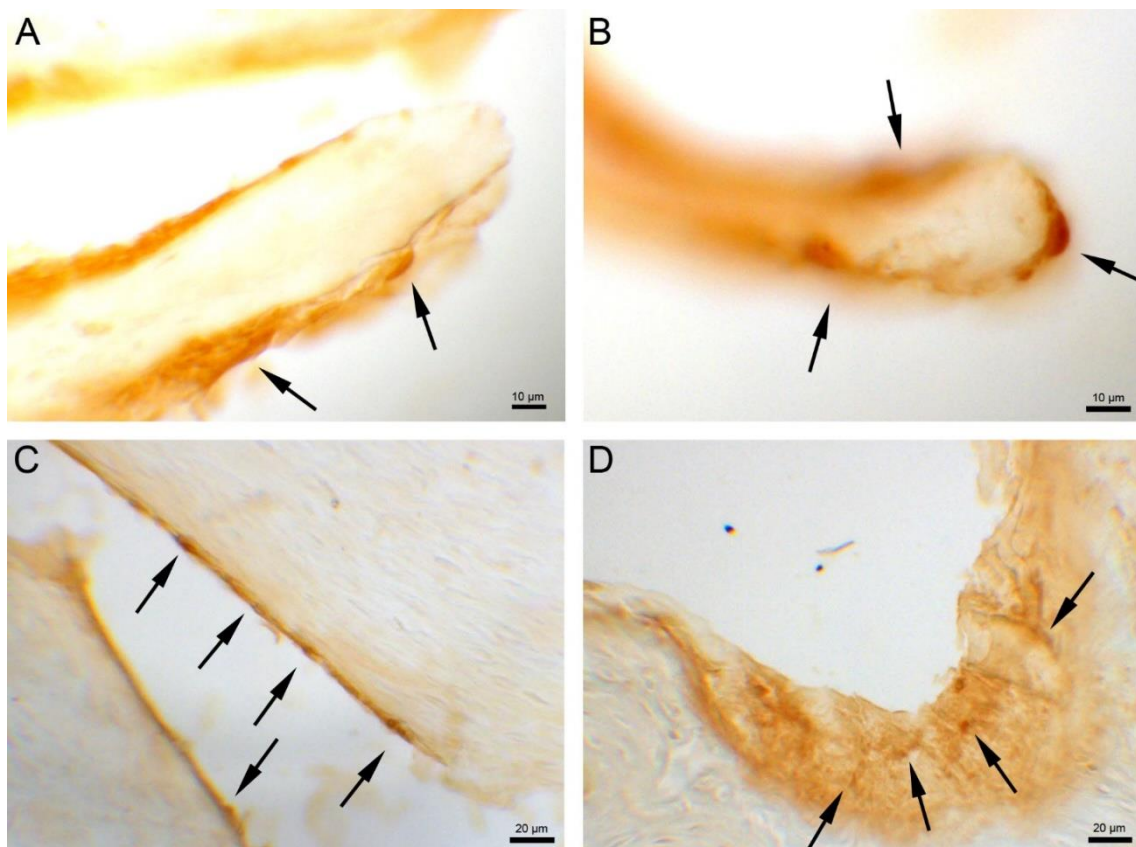
Nerven waren insgesamt im Vergleich zum Hintergrund dunkler gefärbt, da entlang des Nervs Acetylcholin transportiert wird (Abb. 47C). Isolierte Nervenfasern mit ChAT-IR konnten nicht identifiziert werden. In den Ganglien wurden ChAT-ir Nervenzellperikaryen in großer Anzahl gefunden (Abb. 47D).



*Abbildung 47: Es ließen sich ChAT-ir Elemente in der Gefäßwand finden (A). Auch in der Umgebung von Gefäßen ließen sich vermehrt ChAT-ir Elemente beobachten (B). Nerven waren insgesamt etwas dunkler gefärbt (C). ChAT-ir Nervenzellperikaryen im Ganglion (D).*

**dicker Pfeil:** ChAT-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** ChAT-ir Nervenfasern

Um die Gehörknöchelchenkette konnten ChAT-ir Elemente beobachtet werden (Abb. 48). Hammer, Amboss und Steigbügel wurden von einer Schleimhaut umgeben, die ChAT-ir Elemente enthielt und in ihrer Dicke variierte. Einige der ChAT-ir Varikositäten lagen direkt auf dem Knochen auf (Abb. 48C), andere waren tief in der Schleimhaut eingebettet (Abb. 48D).



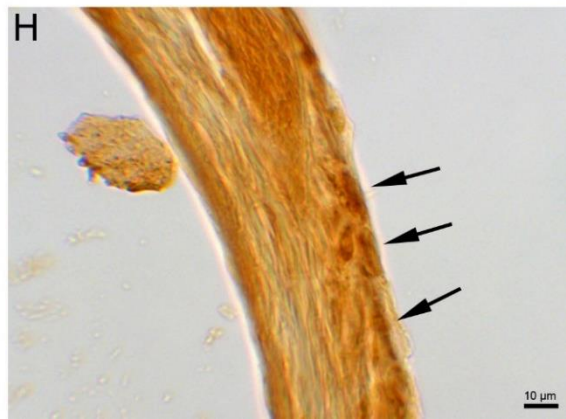
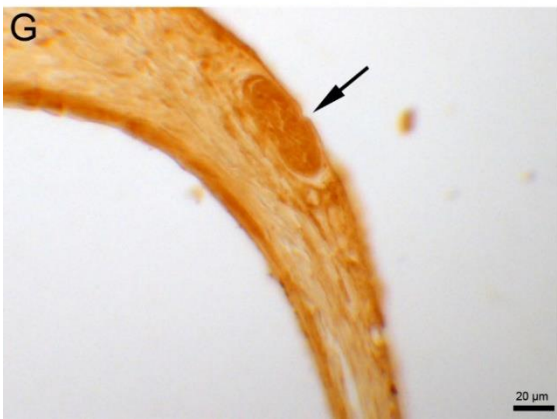
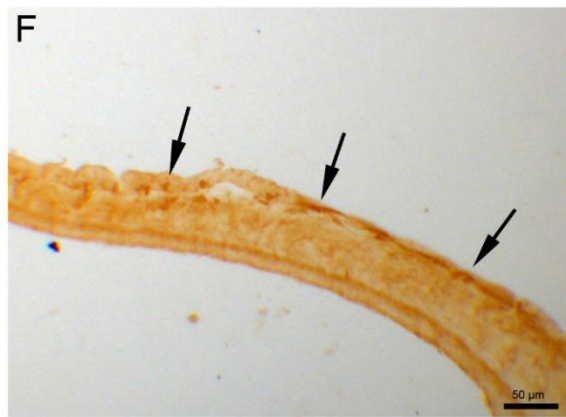
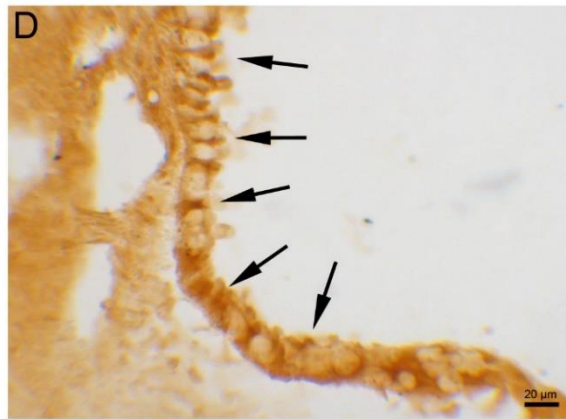
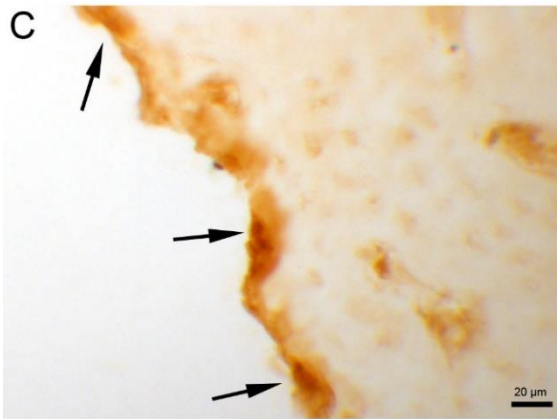
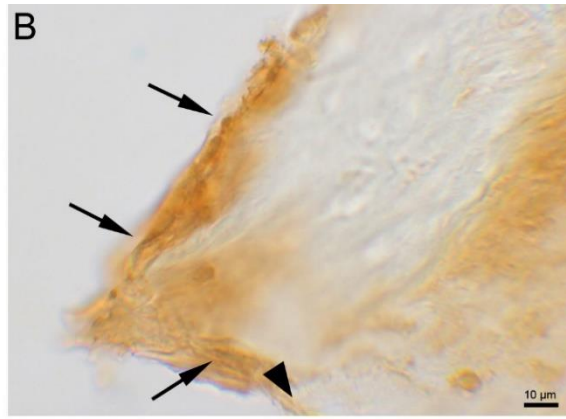
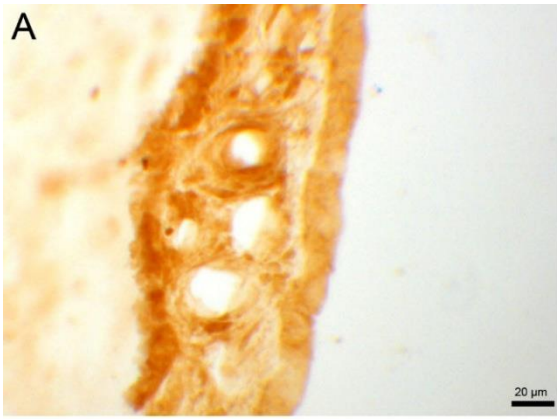
**Abbildung 48:** ChAT-ir Elemente um den Steigbügel (A und B). Direkt am Knochen anliegende ChAT-ir Elemente an Hammer und Amboss (C). ChAT-ir Varikositäten, die tiefer in der Schleimhaut lagen, die die Gehörknöchelchen umgab (D).

**Pfeil:** ChAT-ir Nervenfasern

Die Schleimhaut der Cavitas tympani enthielt ChAT-ir Strukturen in unterschiedlicher Anzahl und Lokalisation. Es konnten ChAT-ir Varikositäten gefunden werden, die von wenig Schleimhaut umgeben waren und gewissermaßen direkt auf dem Knochen lagen (Abb. 49C). In anderen Bereichen gab es eine dicke, locker aufgebaute Schleimhautschicht, in der sowohl im apikalen Epithel als auch in darunterliegenden Bereichen ChAT-ir Elemente zu finden waren (Abb. 49D, E). Die Schleimhaut über dem Gefäßast der A. carotis externa, der durch das Mittelohr in Begleitung eines Nervs zieht, umschloss zahlreiche ChAT-ir Elemente (Abb. 49F - H).

*Abbildung 49: Basal gelegene ChAT-ir Elemente der Schleimhaut der Cavitas tympani (A). Zu den Ansatzstellen des Trommelfells verdichteten sich die ChAT-ir Elemente (B). ChAT-ir Varikositäten in der Mittelohrschleimhaut (C). Aufgelockerte hoch prismatische Schleimhaut beim Promontorium (D und E). Schleimhaut an einem A. carotis externa-Ast im Mittelohr (F). Ein kleiner Nerv direkt benachbart zu dem Ast der A. carotis externa. Daneben zahlreiche ChAT-ir Elemente (G und H). S. Seite 125.*

**dünnere Pfeil:** ChAT-ir Nervenfasern  
**Pfeilspitze:** Richtung Trommelfell

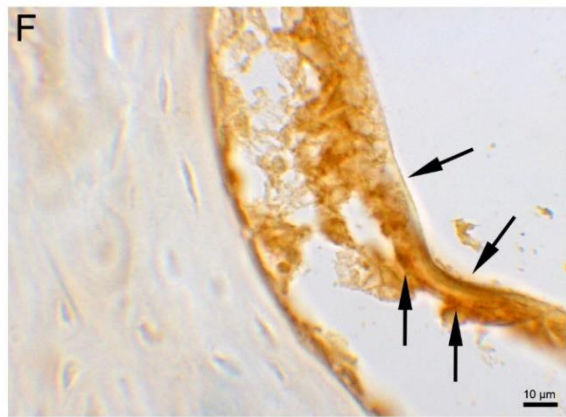
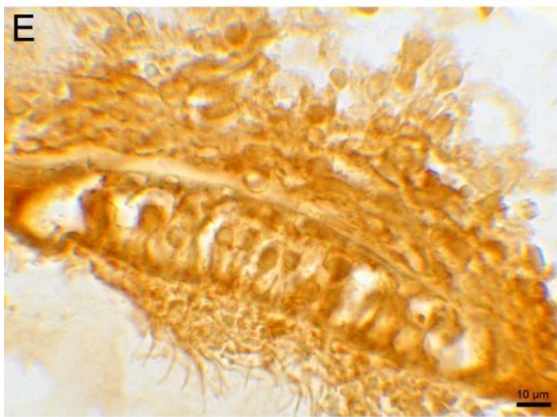
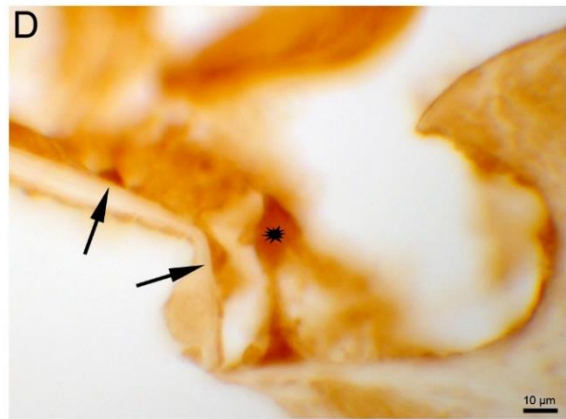
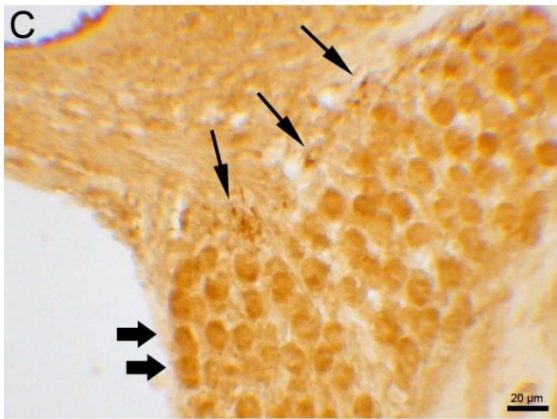
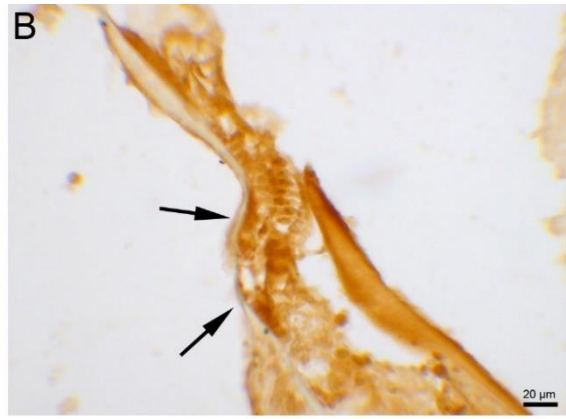
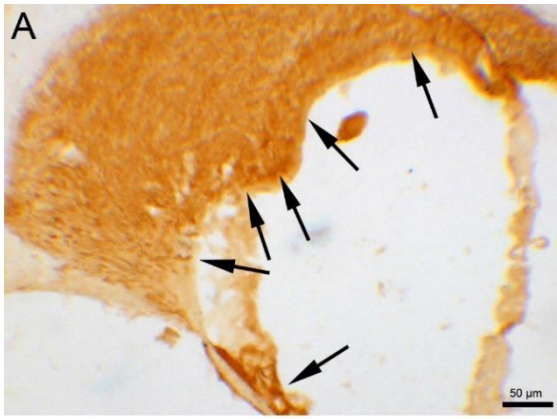


Im Innenohrbereich ließen sich diverse Strukturen mit ChAT-IR in verschiedenen Lokalisationen nachweisen. In der Cochlea zeigte die Stria vascularis und das Corti-Organ ChAT-IR (Abb. 50A, B, D). Basal an den Haarzellen im Corti-Organ ließen sich ChAT-ir Strukturen finden. Daneben färbten sich die Stützzellen und die Tektorialmembran unspezifisch an (Abb. 50D). Die afferenten Fasern des N. cochlearis zeigten ChAT-IR. Ebenso ließen sich ChAT-ir Nervenzellen im Ggl. cochleare im Modiolus nachweisen (Abb. 50C).

Auch im Vestibularapparat waren ChAT-ir Elemente lokalisiert. In den Bogengangampullen zeigte sich an den Sinneszellen und in der epithelialen Auskleidung ChAT-IR (Abb. 50E, F). In der Crista ampullaris konnten ChAT-ir Elemente gefunden werden (Abb. 50G). Auch im afferenten Teil des N. vestibularis ließen sich ChAT-ir Elemente beobachten (Abb. 50H).

*Abbildung 50: Stria vascularis mit ChAT-IR (A). Im Corti-Organ ließen sich ChAT-ir Elemente basal an den Haarzellen und an den Stützzellen nachweisen. Die Tektorialmembran färbte sich unspezifisch (B und D). ChAT-ir Nervenfasern und ChAT-positive Nervenzellperikaryen im Ganglion cochleare (C). ChAT-ir Elemente im Bereich der Bogengangampullen (E - H). Crista und Cupula ampullaris mit ChAT-IR (G und H). Im Epithel des häutigen Labyrinths konnten ChAT-ir Elemente gefunden werden (F). S. Seite 127.*

**dicker Pfeil:** ChAT-ir Perikaryen  
**dünner Pfeil:** ChAT-ir Nervenfasern  
**Sternchen:** Stützzelle







### 3.2 Übersichtsskizzen

Die folgenden Übersichtsskizzen wurden wie in Absatz 2.4 beschrieben angefertigt. Dabei wurde für alle Skizzen der gleiche Maßstab benutzt und die Punktgröße standardisiert. Die Färbung des Gewebes und die Farbauswahl der Punkte sind den Legenden zu entnehmen.

Ein Punkt auf der Skizze entspricht entweder immunocytochemisch angefärbten Zellen, Nervenfasern oder anderen immunreaktiven Elementen. Da es keine quantitative Auswertung ist, kann die Anzahl der Punkte lediglich annähernd die Dichte der immunreaktiven Strukturen darstellen.

Lokalisationen und große Ansammlungen können auf der Basis dieser Darstellung jedoch gut zwischen den verschiedenen Neurotransmittern und -peptiden verglichen werden.

Es folgt nun eine Übersichtsskizze mit den beiden Neurotransmittern Acetylcholin und Noradrenalin durch die immunocytochemische Darstellung ChAT und DBH (s. Abb. 51 und 52). Danach wurde ChAT oder DBH jeweils mit allen drei untersuchten Neuropeptiden kombiniert (s. Abb. 53 bis 64).

Im Anschluss an die Skizzen zur Botenstoffverteilung befindet sich eine zusammenfassende Darstellung (s. Abb. 65 und 66) ohne spezifisch eingefärbte Elemente. Auf dieser sind wichtige anatomische Strukturen bezeichnet. Sie kann zum besseren Verständnis bei der Betrachtung der spezifischen Skizzen herangezogen werden.

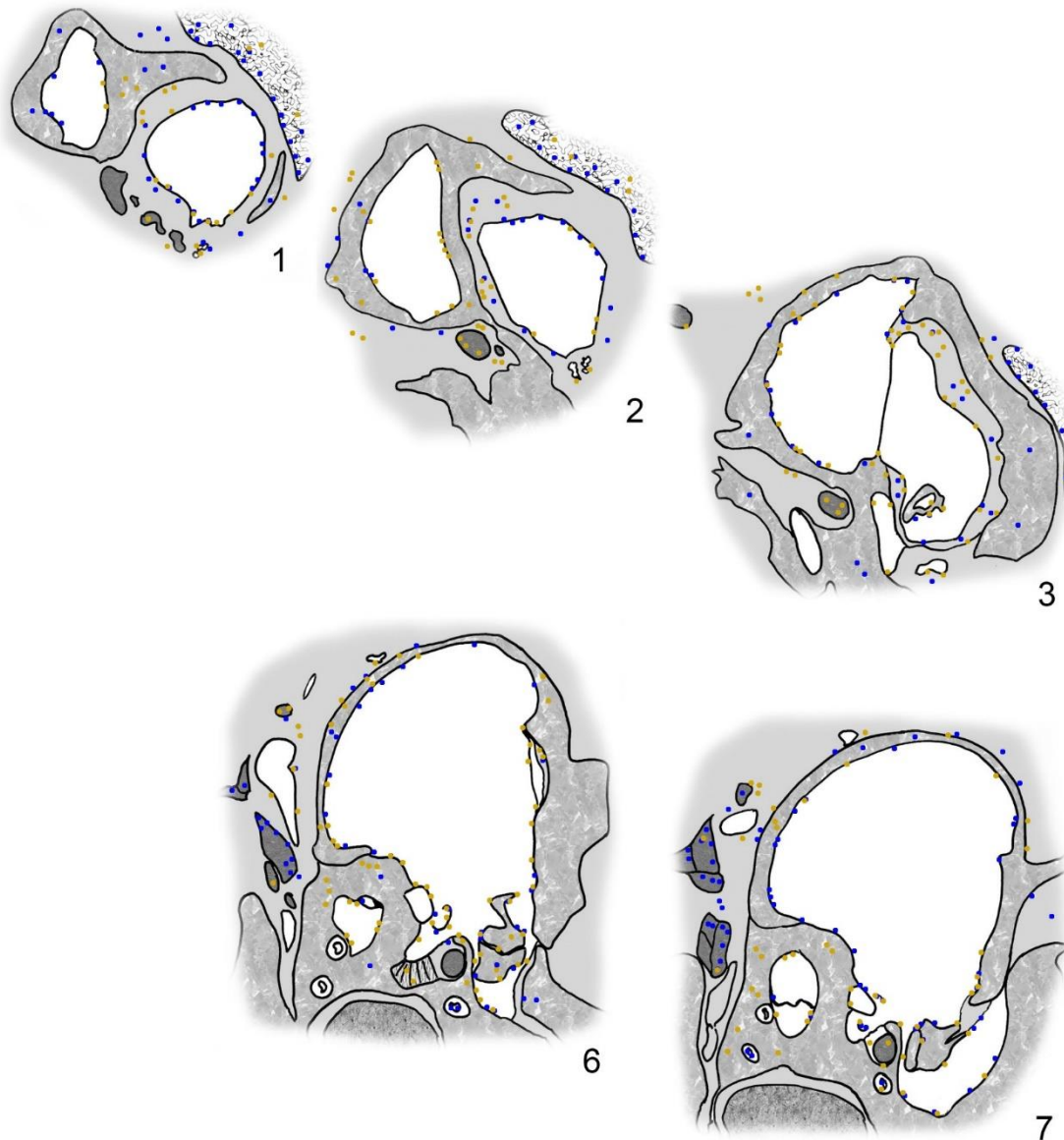




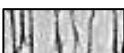



Abbildung 51: Vorkommen von ChAT und DBH – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse

ChAT	blau
DBH	gelb
NPY	grün
SP	rosa
VIP	rot

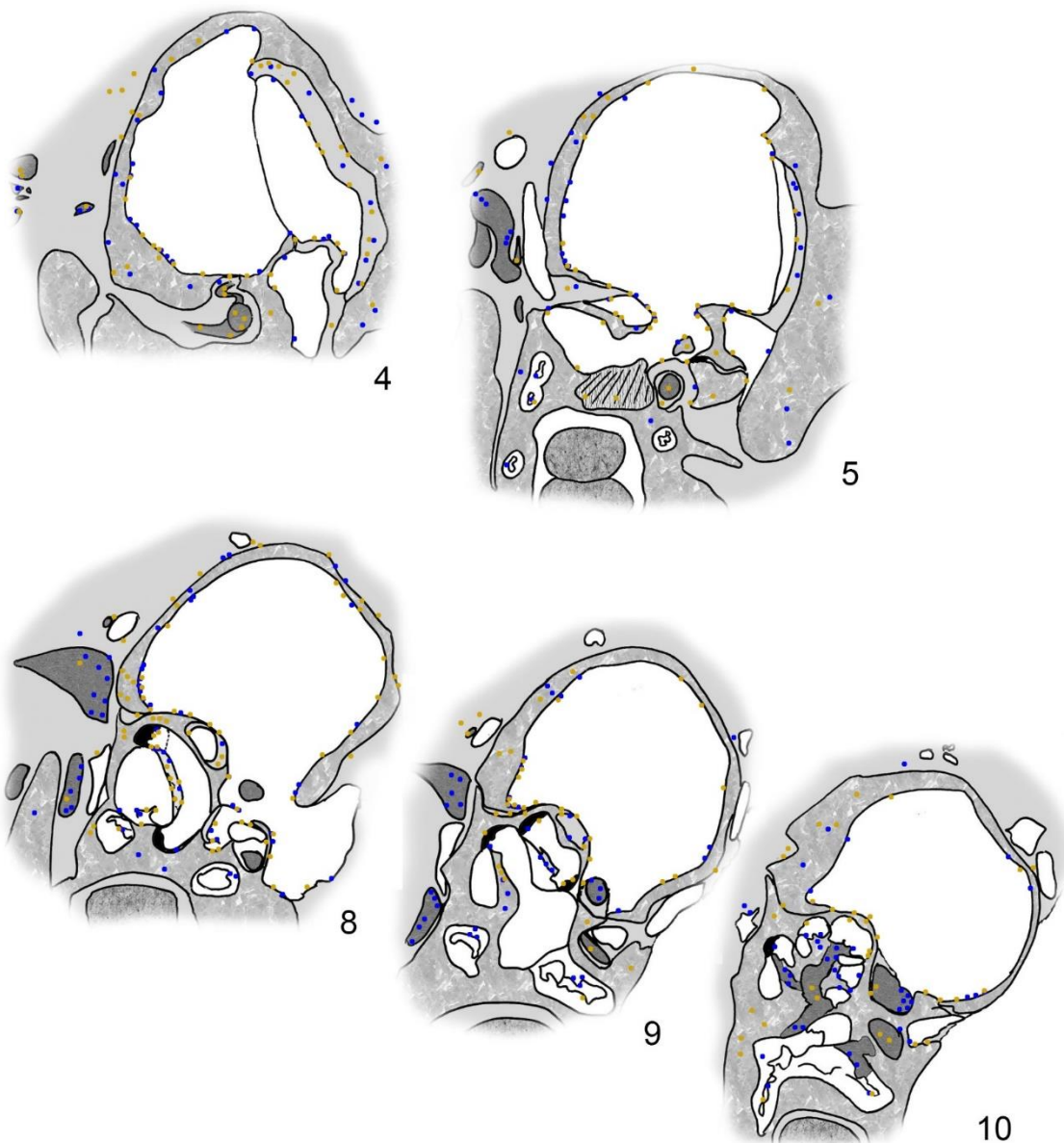


Abbildung 52: Vorkommen von ChAT und DBH – Teil 2. Eigener Befund.

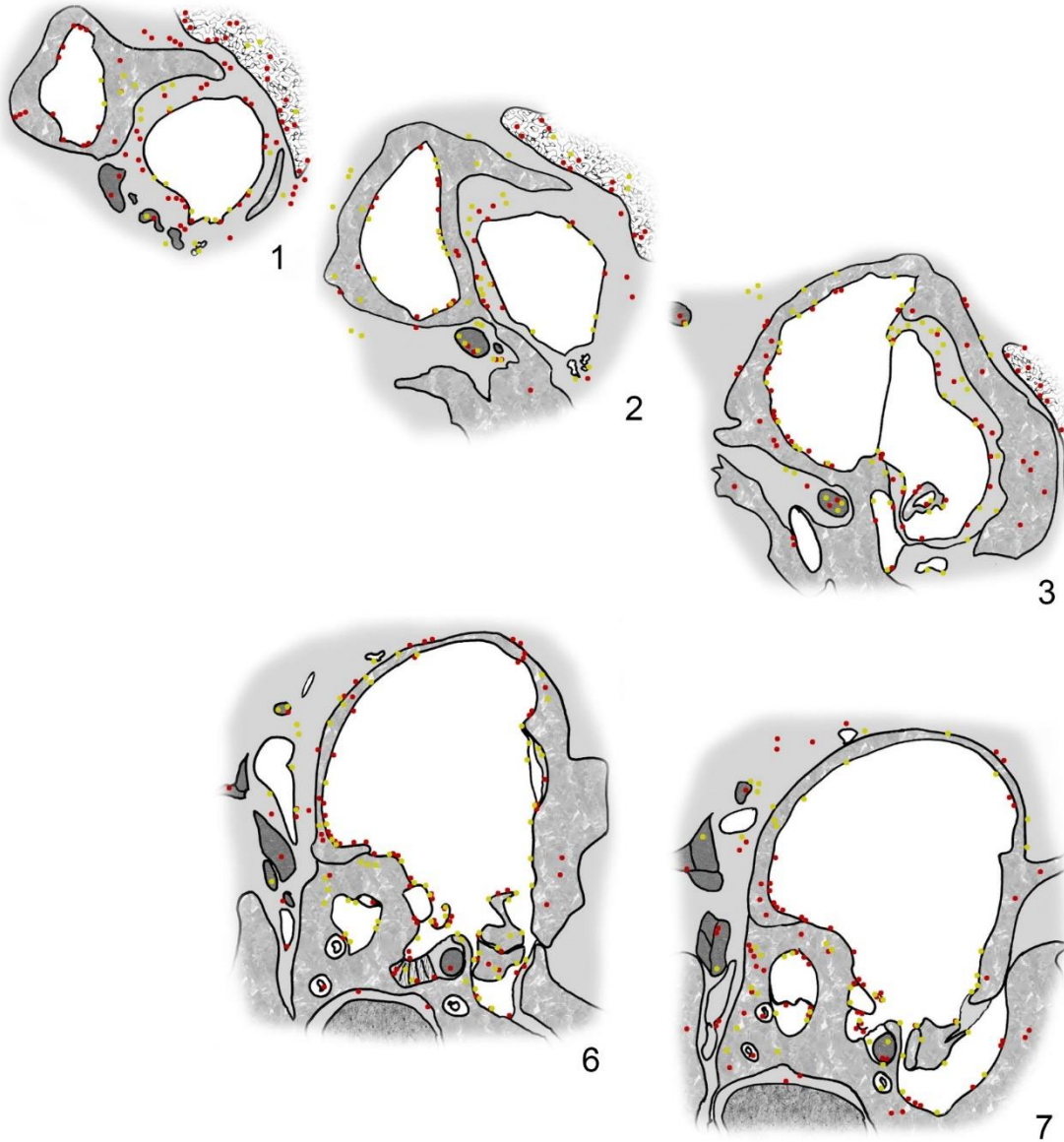




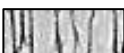



Abbildung 53: Vorkommen von DBH und VIP – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse

ChAT	blau
DBH	gelb
NPY	grün
SP	rosa
VIP	rot

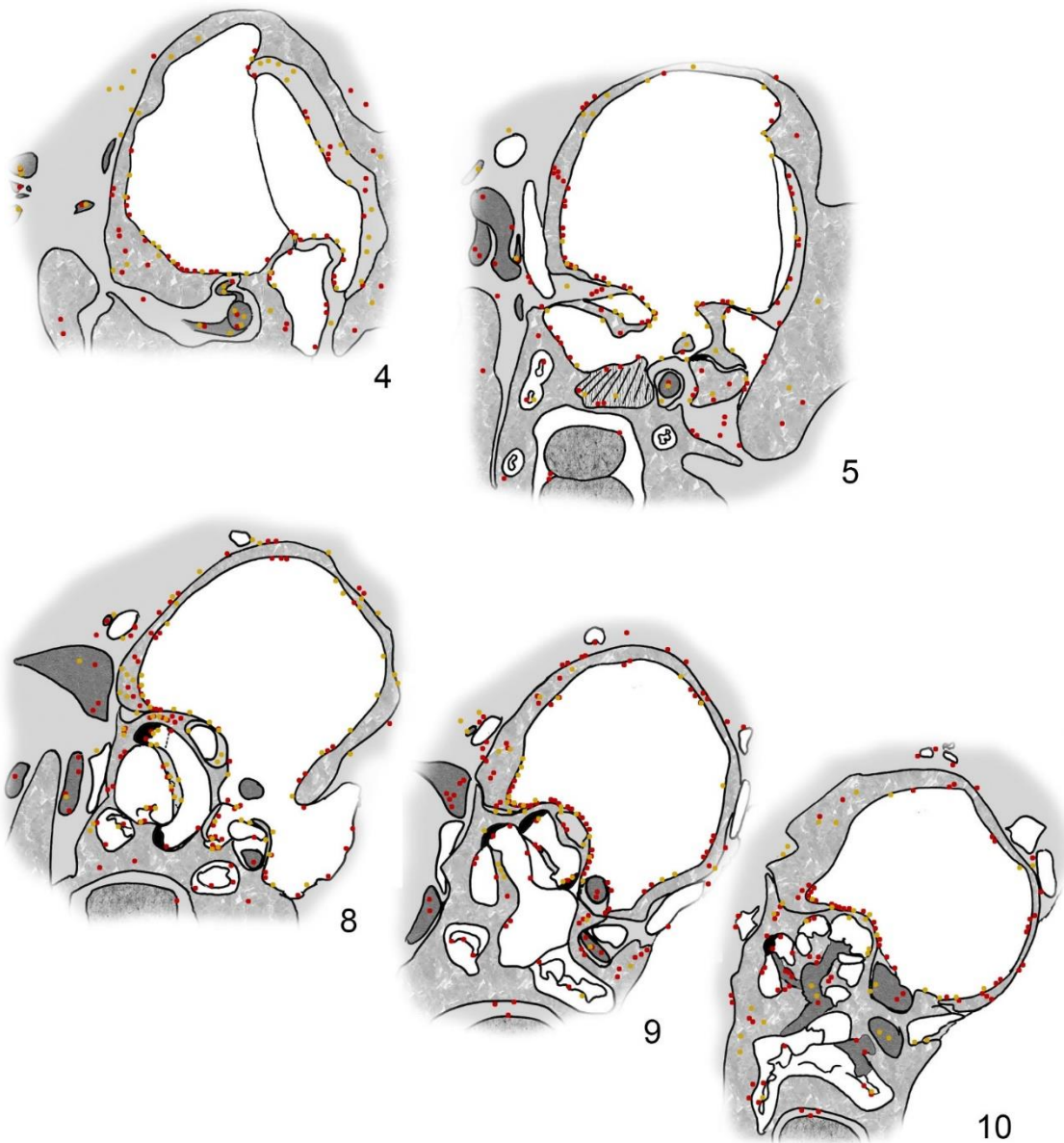


Abbildung 54: Vorkommen von DBH und VIP – Teil 2. Eigener Befund.

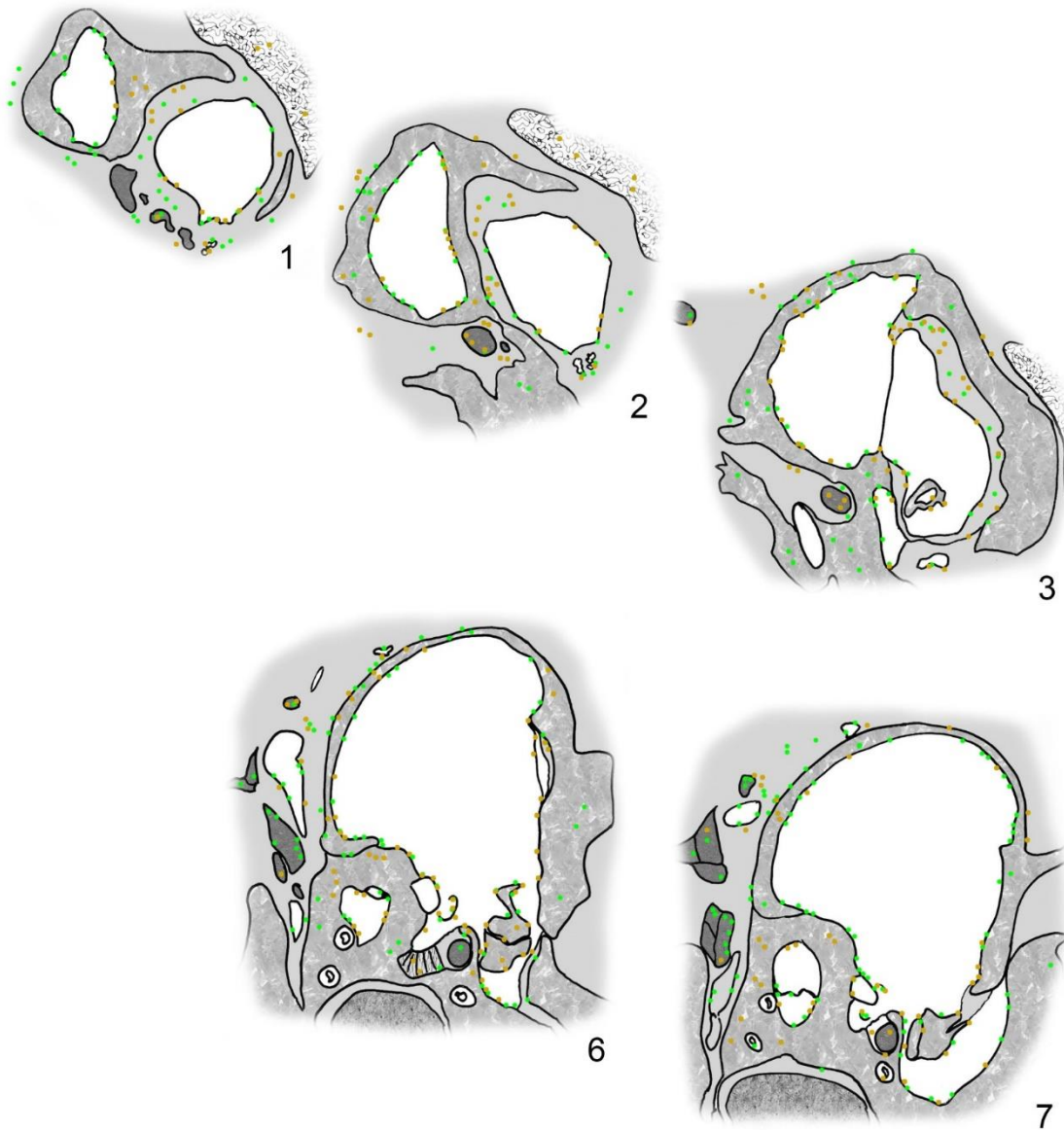

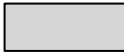


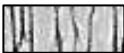



Abbildung 55: Vorkommen von DBH und NPY – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse

ChAT	blau
DBH	gelb
NPY	grün
SP	rosa
VIP	rot

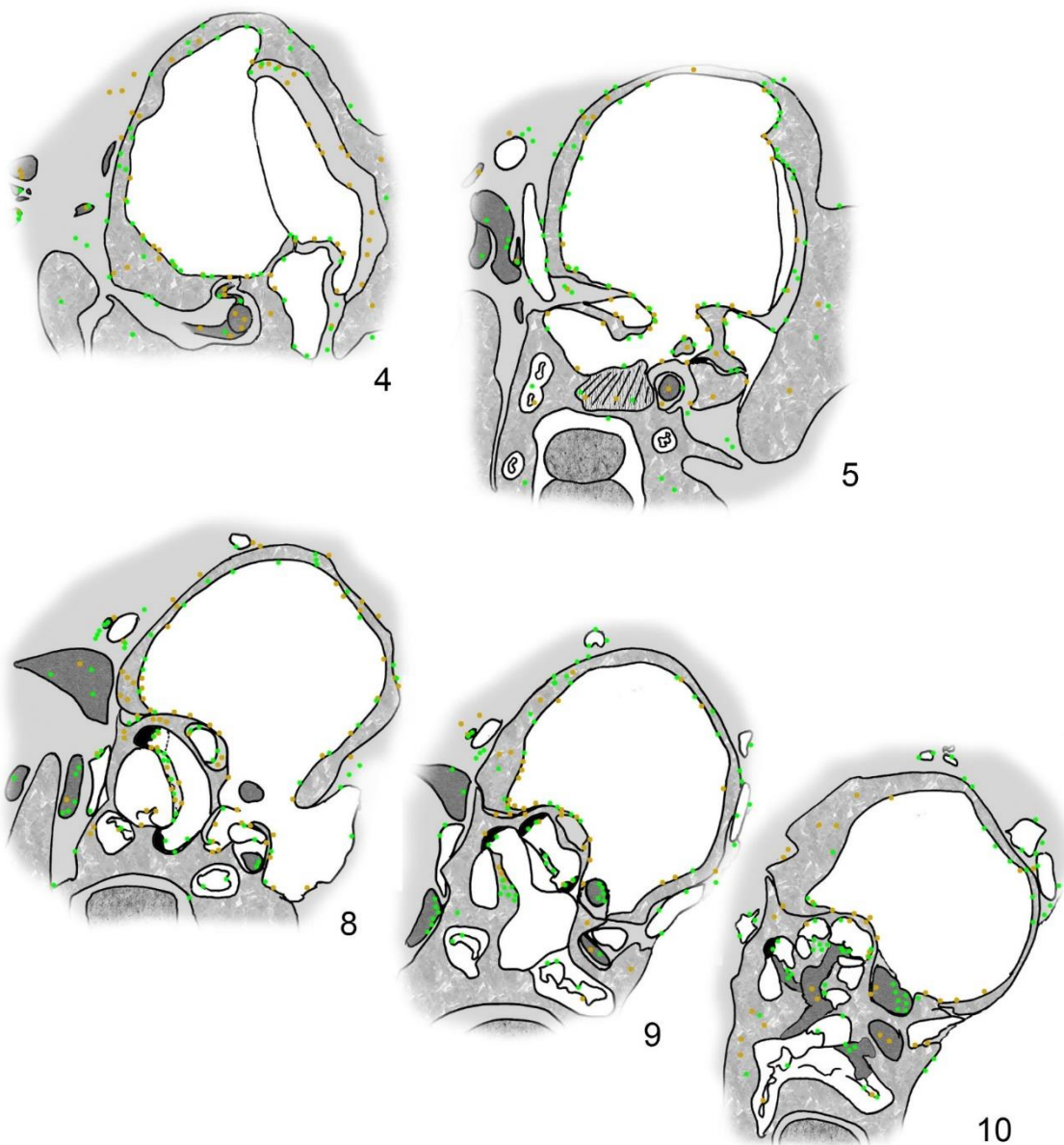


Abbildung 56: Vorkommen von DBH und NPY – Teil 2. Eigener Befund.

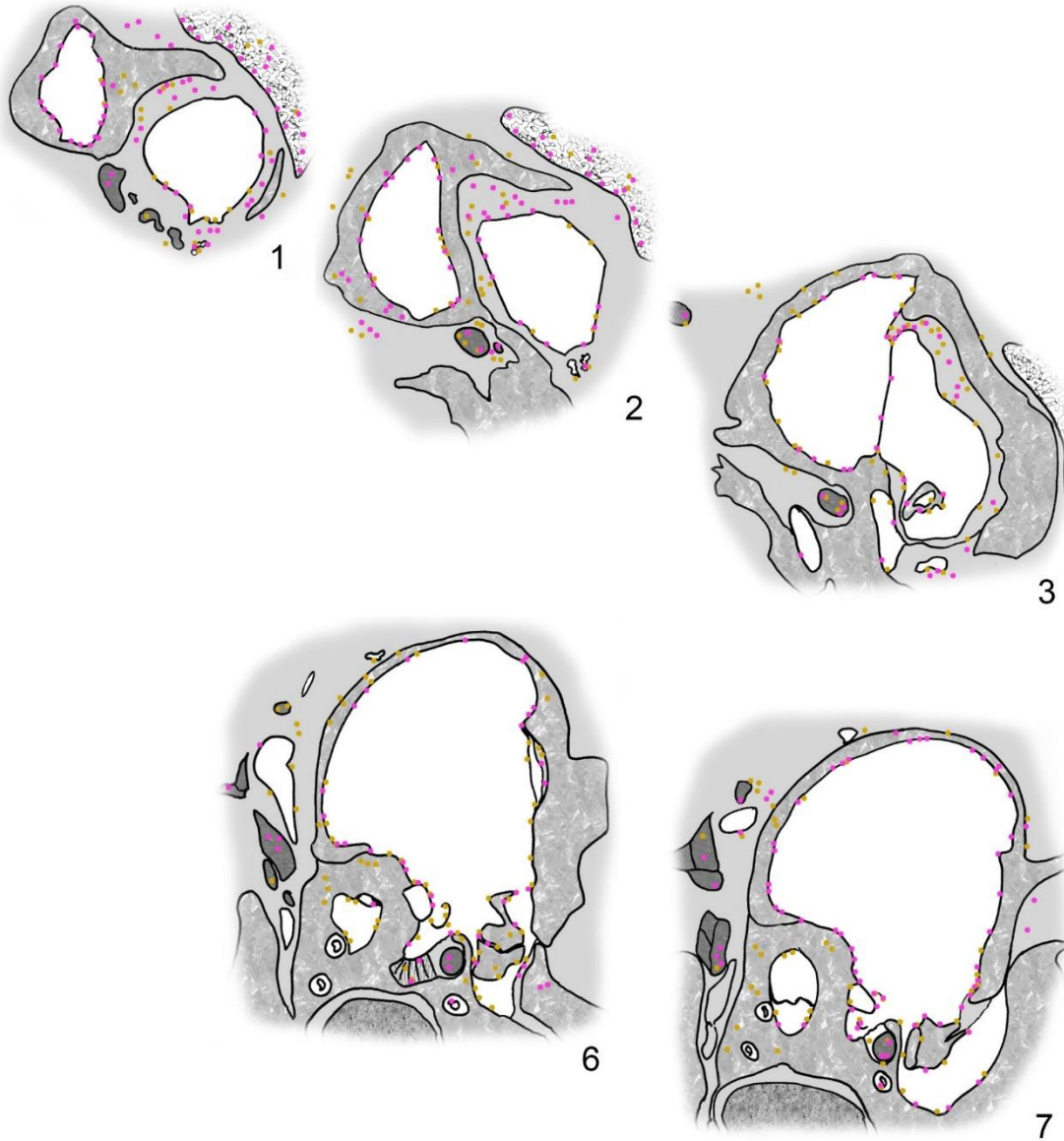




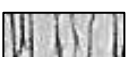



Abbildung 57: Vorkommen von DBH und SP – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse



ChAT	blau
DBH	gelb
NPY	grün
SP	rosa
VIP	rot

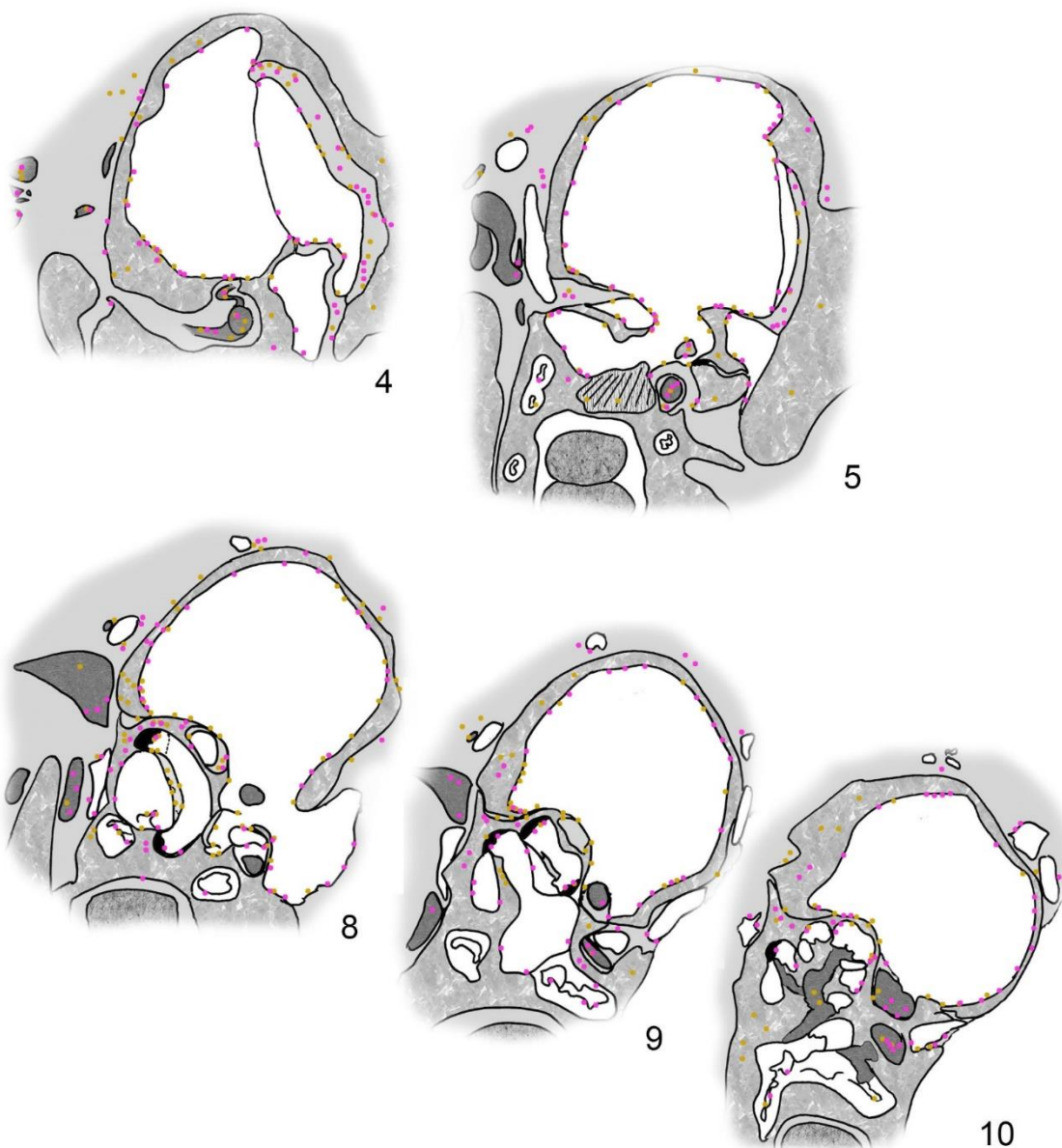


Abbildung 58: Vorkommen von DBH und SP – Teil 2. Eigener Befund.

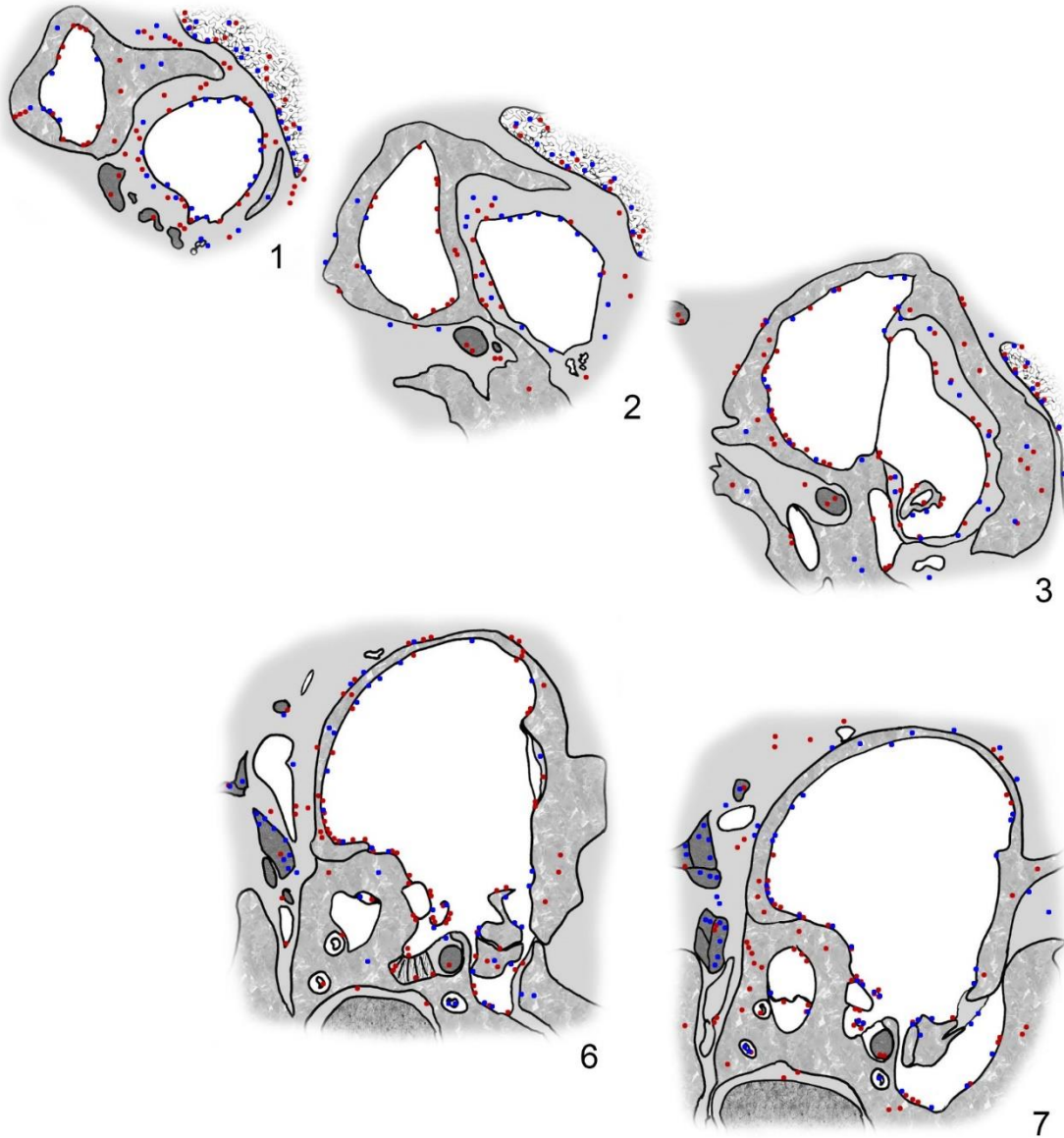




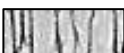



Abbildung 59: Vorkommen von ChAT und VIP – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse

ChAT	blau
DBH	gelb
NPY	grün
SP	rosa
VIP	rot

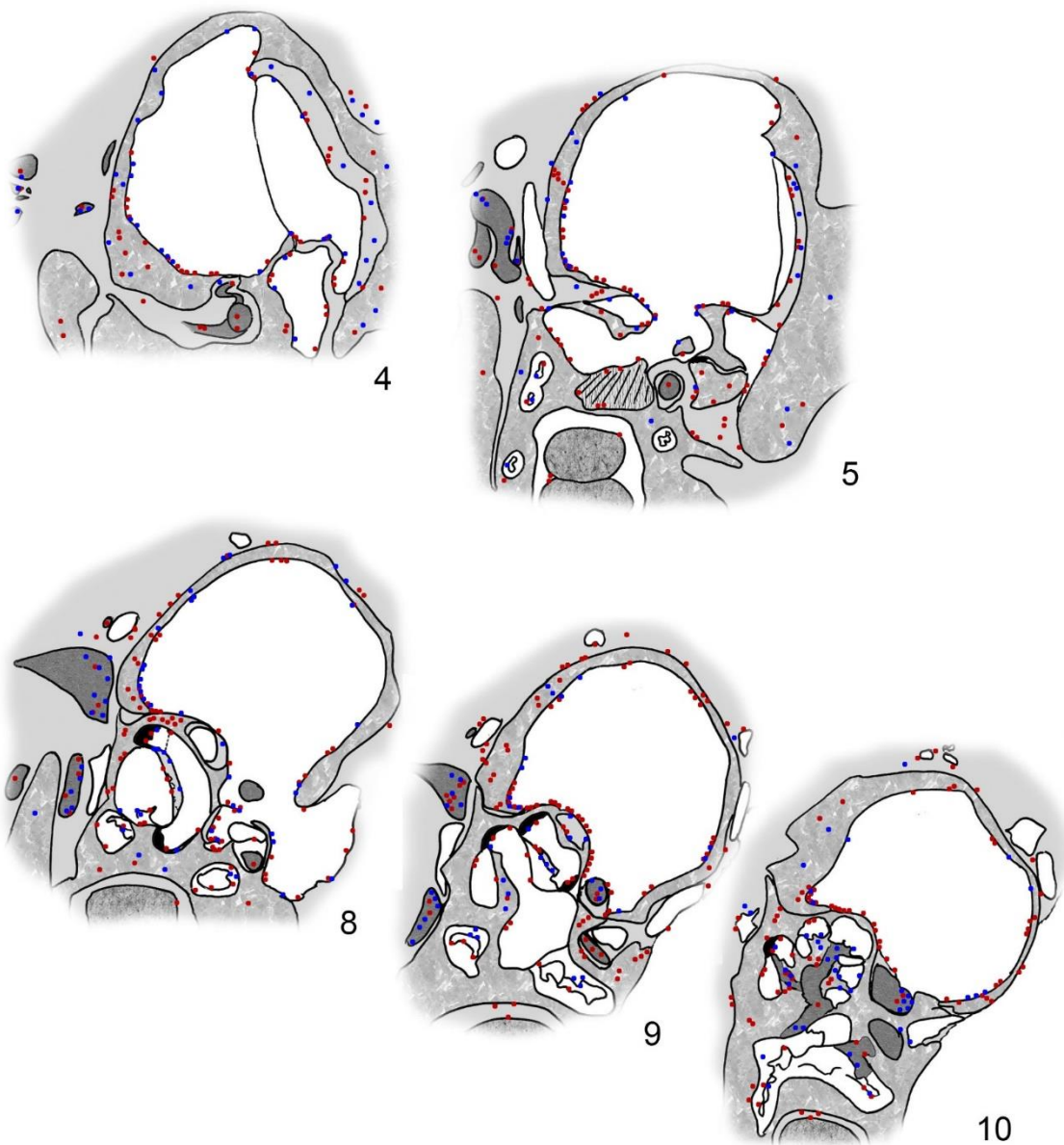


Abbildung 60: Vorkommen von ChAT und VIP – Teil 2. Eigener Befund.

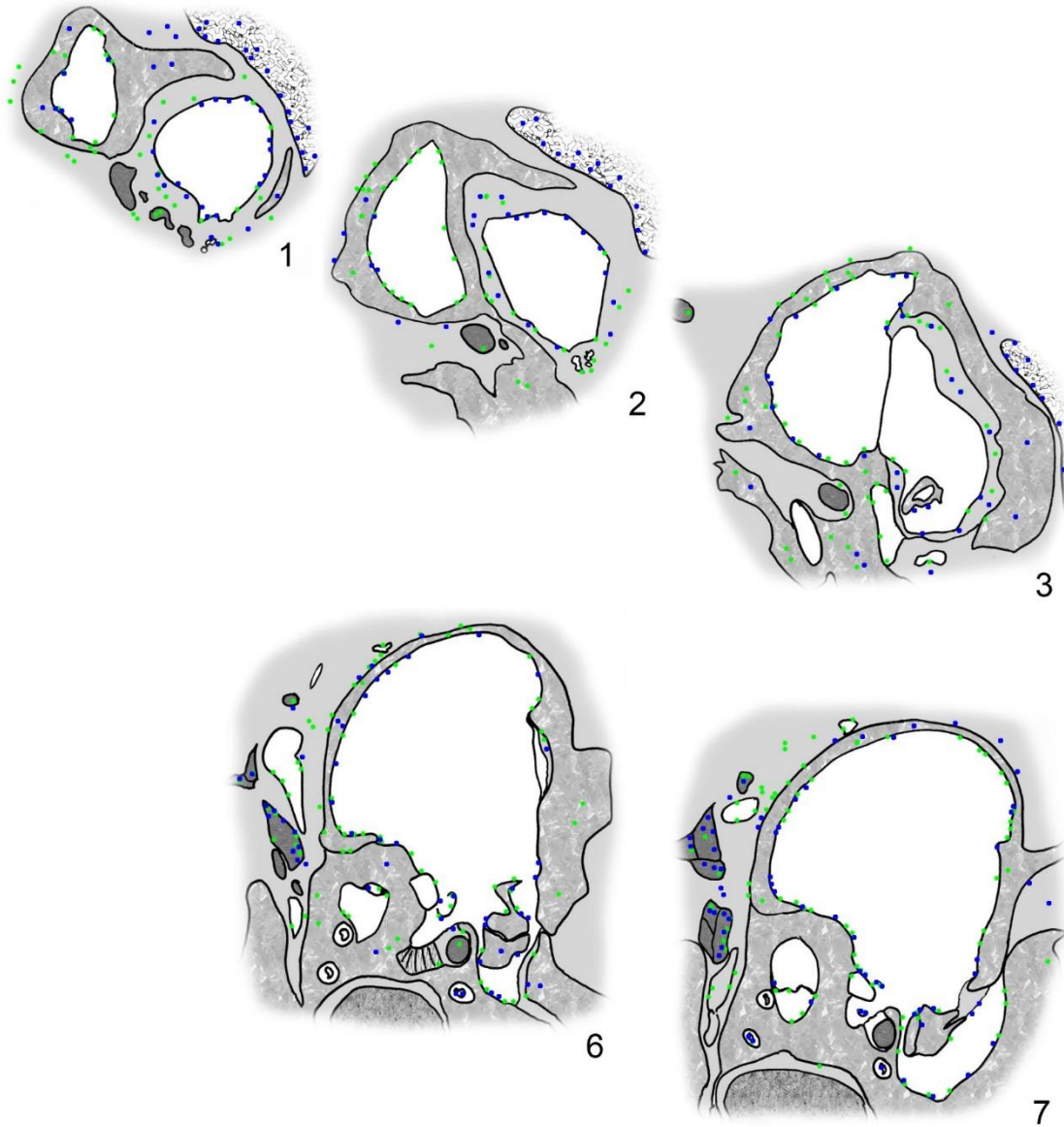




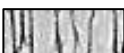



Abbildung 61: Vorkommen von ChAT und NPY – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse

ChAT	blau
DBH	gelb
NPY	grün
SP	rosa
VIP	rot

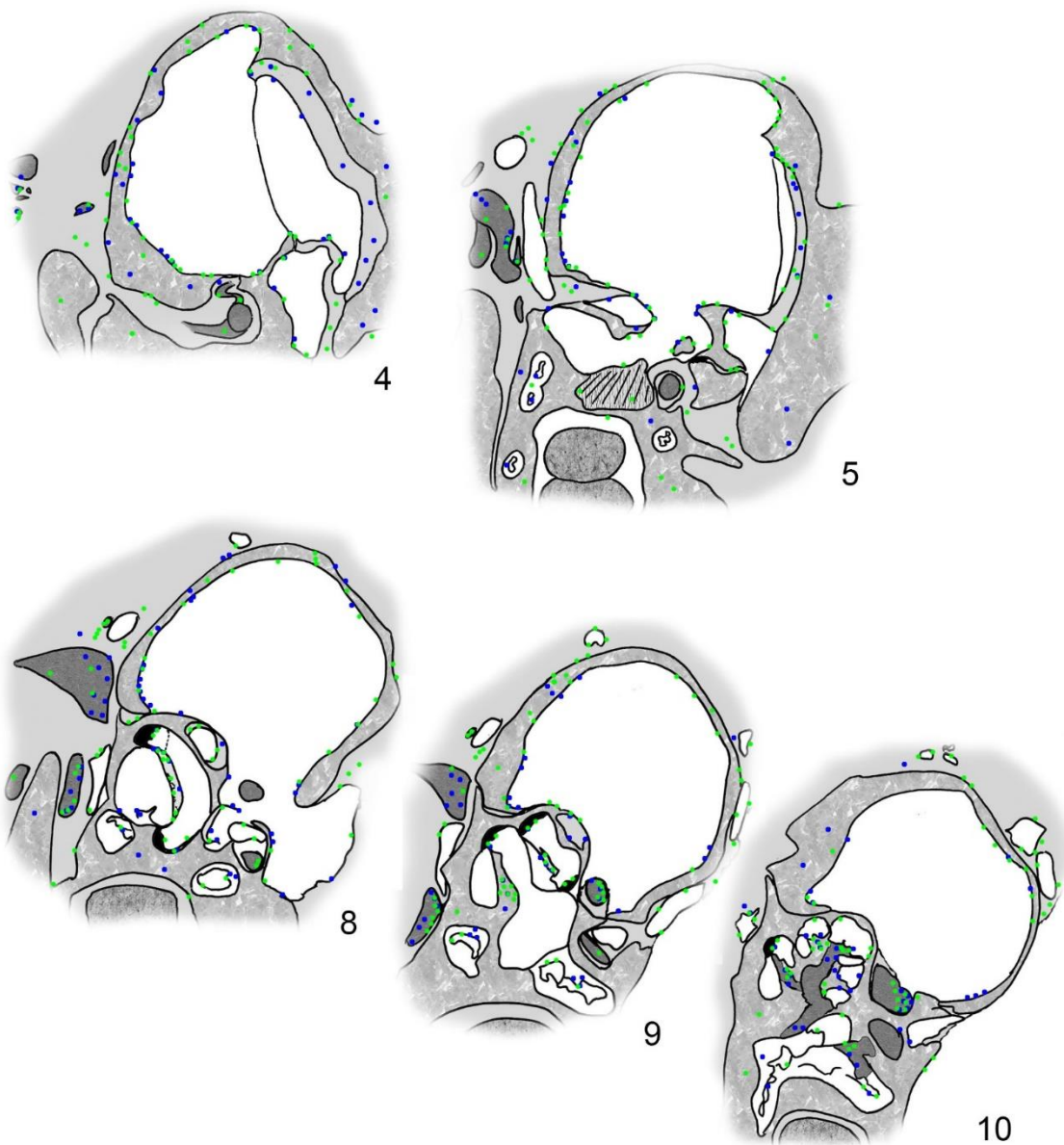


Abbildung 62: Vorkommen von ChAT und NPY – Teil 2. Eigener Befund.

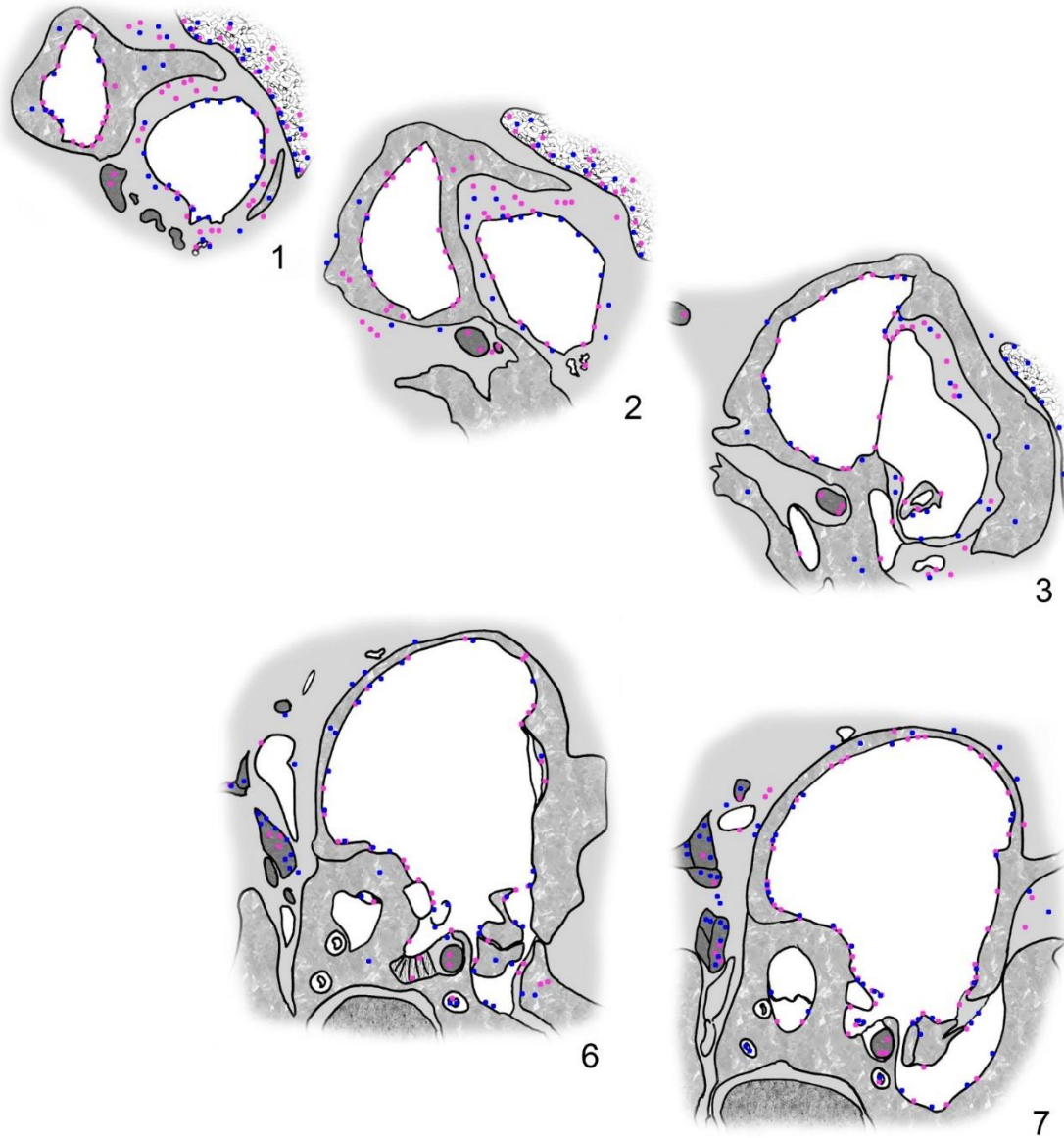




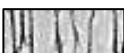



Abbildung 63: Vorkommen von ChAT und SP – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse

ChAT	blau
DBH	gelb
NPY	grün
SP	rosa
VIP	rot

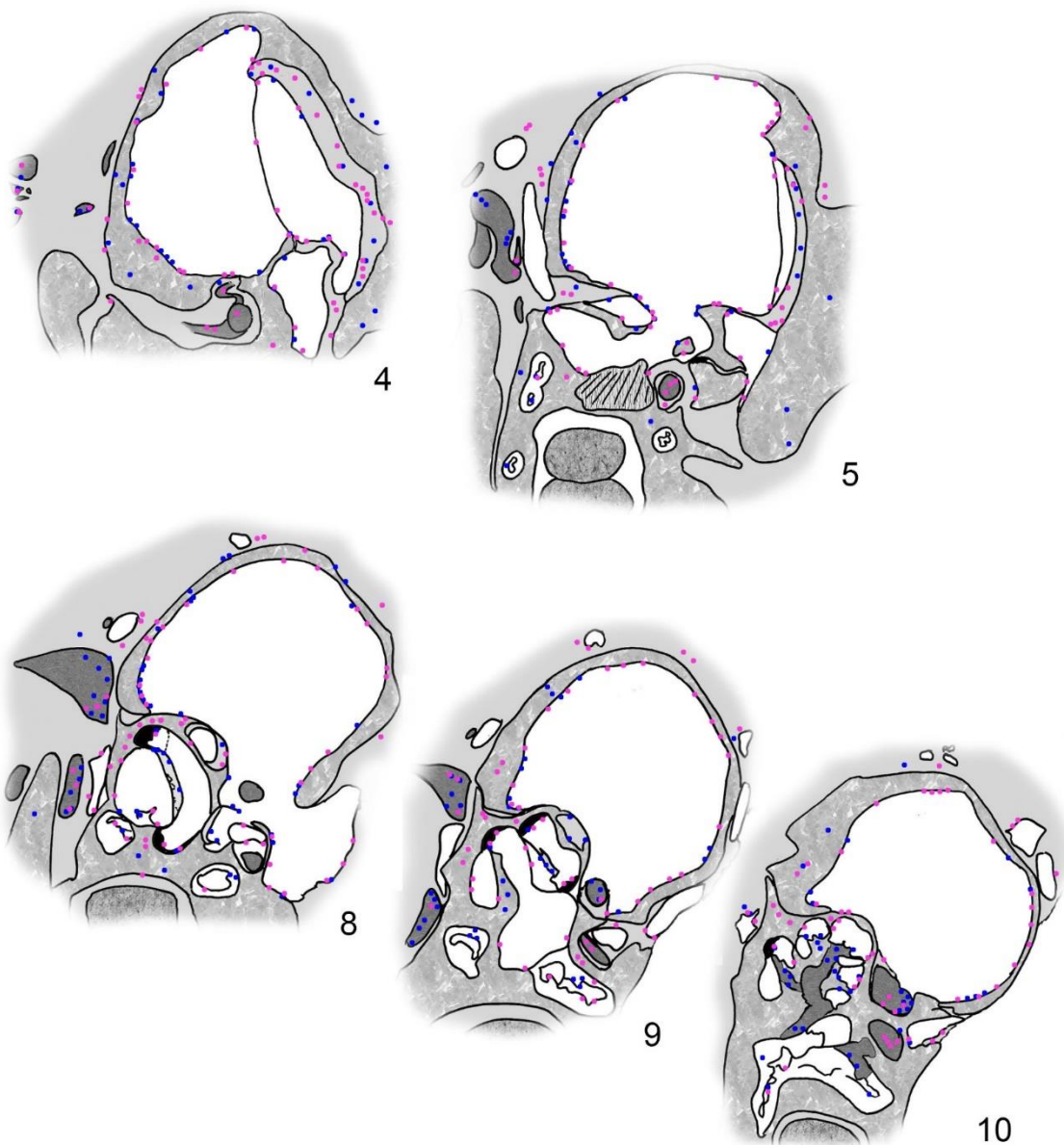


Abbildung 64: Vorkommen von ChAT und SP – Teil 2. Eigener Befund.

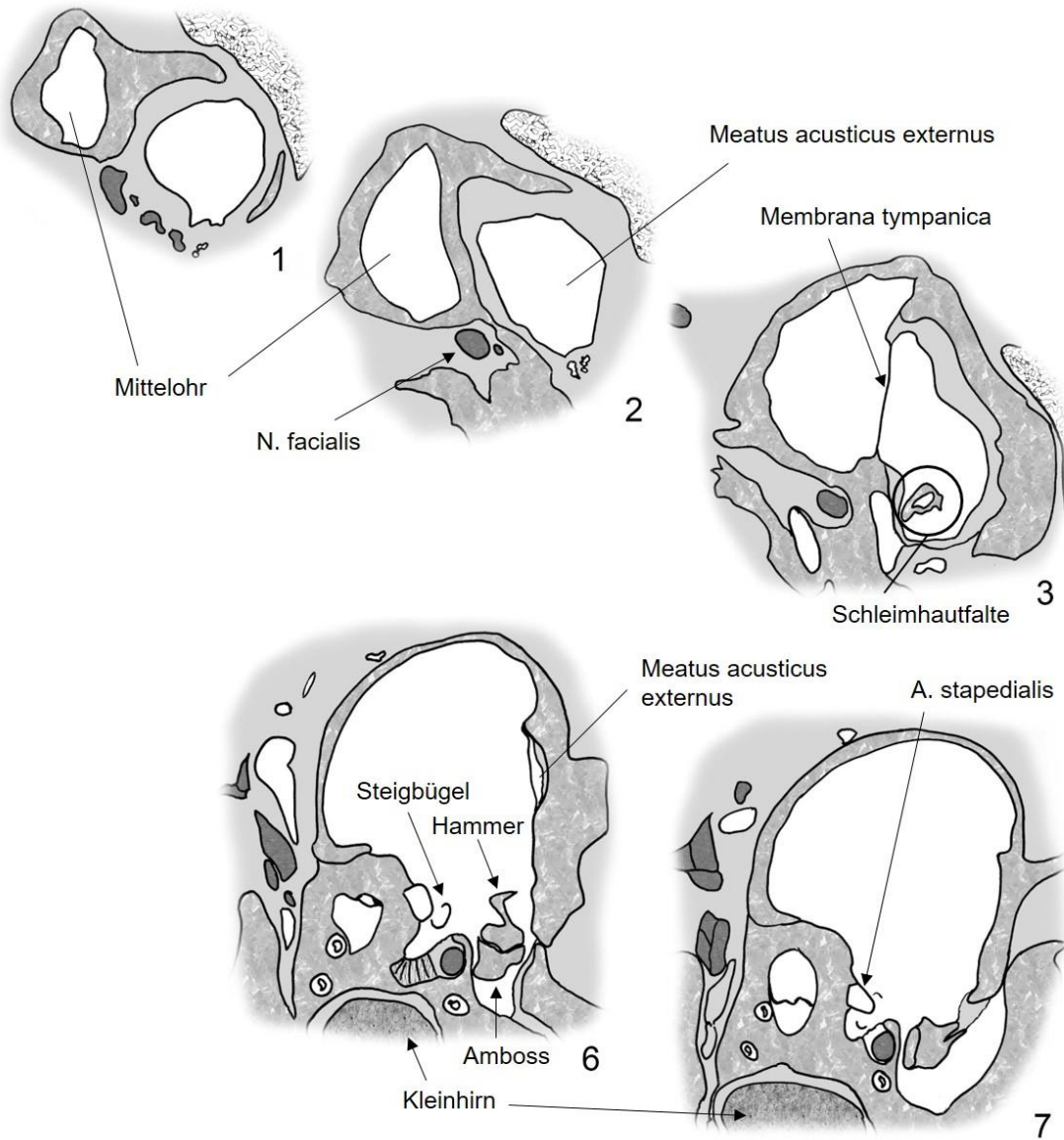


Abbildung 65: Zusammenfassende Darstellung – Teil 1. Eigener Befund.

<u>Legende</u>			
	Knochen		Gewebe
	Nerv		Gehirn
	Muskel		Drüse



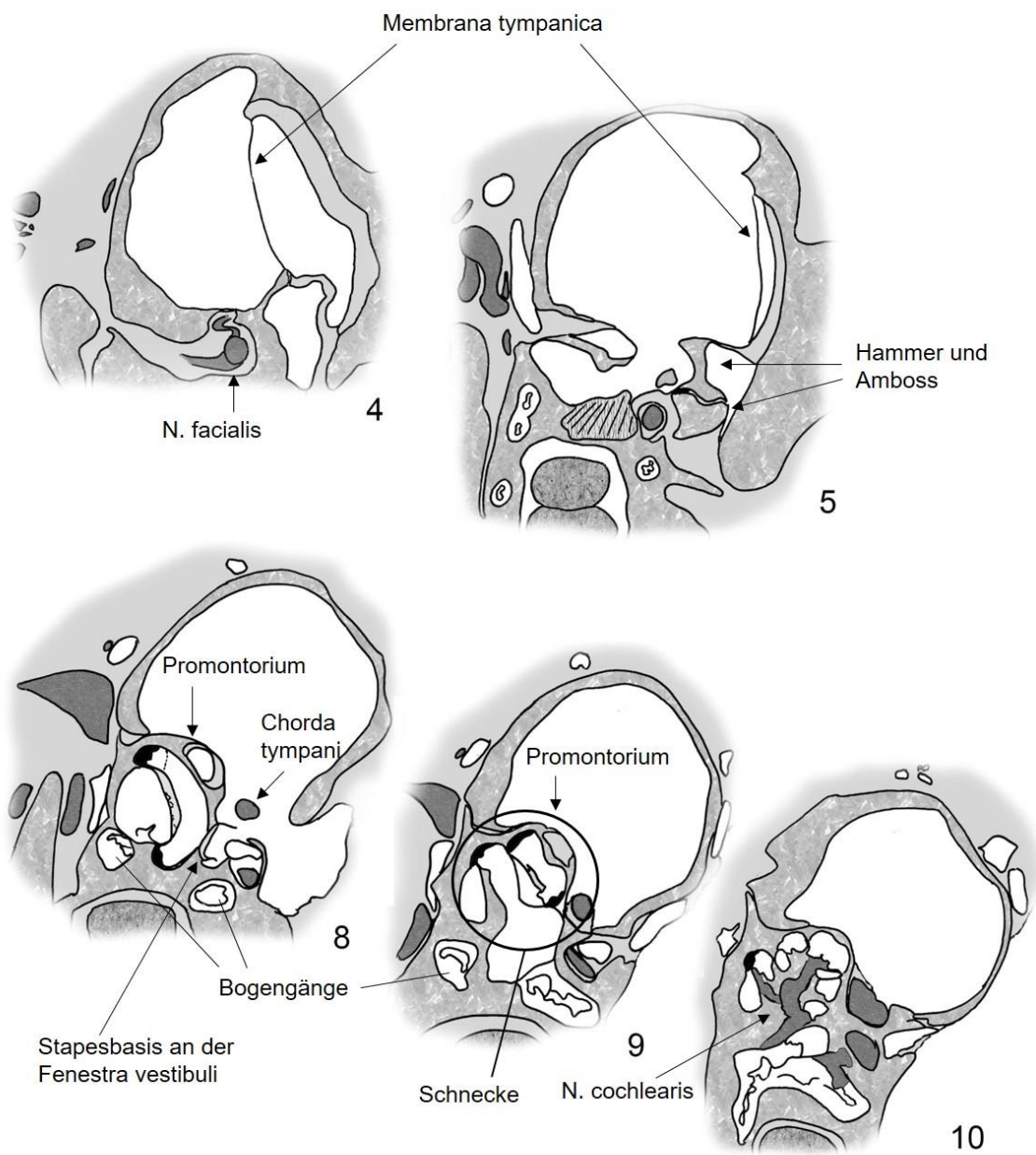


Abbildung 66: Zusammenfassende Darstellung – Teil 2. Eigener Befund.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodenkritik und Optimierungsmöglichkeiten der Techniken

Für die vorliegende Arbeit wurde die indirekte Methode der Immuncytochemie mit der Visualisierung über eine Peroxidasereaktion gewählt. Trotz der hohen Sensitivität dieser immuncytochemischen Technik hat auch diese einige Limitationen, die mitsamt potentieller Optimierungsmöglichkeiten im Folgenden erläutert werden sollen.

Für eine optimale Ergebnisqualität einer immuncytochemischen Färbung stehen bei einem Antikörper (AK) eine hohe Avidität, Affinität, Spezifität und Sensitivität im Vordergrund.<sup>216</sup>

Eine hohe Spezifität eines Antikörpers zeigt sich durch die spezifische Bindung an das gewünschte Antigen mit möglichst wenig Kreuzreaktivität und damit einer niedrigen unspezifischen Hintergrundfärbung. Diese Hintergrundtingierung kommt durch unspezifische Bindungen an Oberflächenmoleküle von anderen Zellen oder Geweben, die dem Antigen ähneln, zustande. Es gibt Unterschiede in der Spezifität zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern.

Monoklonale AK, die in Hybridzomzellen, das sind B-Zellen eines immunisierten Tieres, die mit Myelomzellen auch anderer Arten fusioniert wurden, hergestellt werden, sind alle gegen ein einziges Epitop gerichtet. Sie weisen eine exzellente Monospezifität auf und zeigen nur ein minimales Maß an Hintergrundfärbung.

Polyklonale AK haben meist auch eine gute, aber im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern niedrigere Spezifität. Eine Hintergrundfärbung ist unvermeidbar, da polyklonale AK aus einem Mischserum gewonnen werden, welches AK enthält, die gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet sind, da sie nicht nur in einer, sondern in mehreren verschiedenen B-Zellen produziert wurden.

Ein weiterer Vorteil der monoklonalen AK liegt in der praktisch unbegrenzten Herstellung durch die Hybridomzellen. Inzwischen sind viele verschiedene monoklonale AK verfügbar, die je nach AK eine höhere oder niedrigere Signalstärke haben. Eher von Nachteil ist die hohe Affinität, die für eine Bindung mit monoklonalen Antikörpern benötigt wird.

Polyklonale AK haben eine hohe Signalstärke und stabile und multivalente Interaktionen.<sup>213</sup> Sie erkennen ihr Antigen über die Bindung an mehrere verschiedene Epitope, da bei der Immunisierung AK gegen verschiedene Epitope eines Antigens gebildet werden. Dies ist von Vorteil, wenn es sich um ein sehr kleines Antigen mit wenigen Epitopen handelt. Bei diesem können dann mehrere AK an verschiedene Epitope binden und damit einen Nachweis ergeben, wohingegen dies mit monoklonalen Antikörpern, die nur gegen ein Epitop gerichtet sind, weitaus schwieriger ist. Positiv ist bei polyklonalen Antikörpern außerdem die recht preisgünstige und schnelle Immunisierung und Gewinnung in ausreichender Menge.<sup>217</sup>

Die Stärke einer multivalenten Bindung wird als Avidität bezeichnet und beschreibt die Gesamtheit der Affinitäten. Eine hohe Avidität zeigt sich in einer starken nicht-kovalenten Bindung zwischen dem Paratop des Antikörpers und dem Epitop. AK mit einer hohen Affinität werden in einer niedrigeren Konzentration benötigt, da die Bindungen sehr schnell eingegangen werden und stabil sind. Diese rasche und stabile Sättigung von Antigenen mit den Antikörpern ist vorteilhaft, weil die AK in den Waschschritten seltener weggespült werden, insgesamt eine niedrigere Arbeitskonzentration benötigt wird und die Inkubationszeiten kürzer gehalten werden können.<sup>213,217</sup>

Weiterhin sollte darauf geachtet werden, dass die Verdünnung so hoch wie möglich gewählt wird, da alle AK auch unspezifische Bindungen eingehen. In dieser Studie wurden zuvor unterschiedliche Verdünnungen getestet bis letztendlich die Verdünnung ausgewählt wurde, bei der eine möglichst starke Anfärbung der gesuchten Strukturen bei möglichst geringer Hintergrundfärbung beobachtet wurde. Die unspezifischen Bindungen der AK sind zwar in ihrem Signal viel schwächer, trotzdem sollten sie möglichst vermieden werden. Daher ist es sinnvoll mögliche Bindungsstellen schon vor der Inkubation mit Rinderserumalbumin zu blockieren.<sup>216</sup>

Die verwendeten Antikörper sind bereits in früheren immuncytochemischen Untersuchungen ausgiebig getestet worden und haben sich schon in einer Vielzahl von Studien bewährt.<sup>196</sup> Daher wurde auf eine Negativtestung, also ein Ersetzen beispielsweise des Primärantikörpers durch eine Puffersubstanz bei

sonst normal durchgeführtem Färbeprotokoll, bei dieser Untersuchung verzichtet. Genauso wurde auch eine zusätzliche Positivtestung nicht durchgeführt, bei der der AK an Geweben angewendet wird, die sicher das spezifische Antigen enthalten. Diese Tests wurden bereits im Rahmen anderer Studien an den gleichen Labortierrassen in unserem Laboratorium durchgeführt.

Temperatur und Zeit der Inkubation stehen in einer umgekehrten Beziehung zueinander. Bei niedrigen Temperaturen, wie z. B. 4°Celsius, und einer Inkubation über Nacht werden die besten Ergebnisse mit einer nur geringen Hintergrundfärbung erreicht.<sup>218</sup> Im Färbeprotokoll dieser Arbeit wurden die Schnitte bei Raumtemperatur und längerer Inkubationszeit inkubiert. Während die Zeit möglichst gleich lang gewählt wurde, unterlag die Temperatur den natürlichen Schwankungen, die sich jedoch im Bereich von wenigen °Celsius hielten.

Die Fixierung für die Immuncytochemie ist der erste kritische Schritt in der Materialgewinnung. Hierbei steht die Erhaltung morphologischer Strukturen im Vordergrund, jedoch soll gleichzeitig die Antigenität erhalten werden. Die Fixierung mittels Paraformaldehyd vernetzt Proteine im Gewebe miteinander und kann die Immunreaktivität von einigen Epitopen zerstören. Dennoch ist die Perfusionsfixierung, wie sie auch in dieser Arbeit benutzt wurde, zu präferieren.<sup>213</sup>

Die ABC-Methode wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität ausgewählt. Die Affinität von Biotin zu Avidin ist sehr hoch und damit ist diese annähernd irreversible Bindung wenig anfällig für Fehler. Damit übertrifft sie andere Methoden wie z. B. die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) -Technik.<sup>218</sup>

Wie in Absatz 2.3.1 beschrieben, ist es von Vorteil, dass an den biotinylierten Sekundärantikörper viele Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe binden können. Dadurch wird die Sensitivität erhöht. Binden jedoch zu viele Komplexe kann der Gesamtkomplex so groß werden, dass die Sensitivität durch sterische Behinderung wieder abnimmt, da die Anzahl der enzymatisch aktiven Moleküle sinkt.<sup>55</sup>

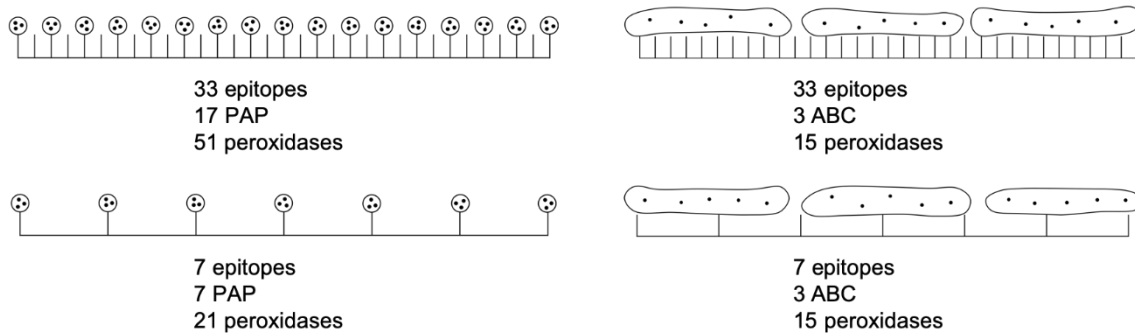


Abbildung 67: Einfluss der sterischen Behinderung (*steric hindrance*).  
Modifiziert nach Sternberger 1986.

In Abb. 67 wird die PAP-Methode der ABC-Methode gegenübergestellt. Auf der rechten Seite soll gezeigt werden, dass trotz unterschiedlicher Epitopanzahl – in der oberen Skizze sind 33 Epitope dargestellt, in der unteren nur sieben Epitope – jeweils nur drei Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe binden und damit 15 Peroxidasen aktiv sind. Aufgrund der sterischen Behinderung der großen Komplexe binden selbst bei hoher Epitopanzahl nur wenige Komplexe, außerdem sind weniger Moleküle enzymatisch aktiv.<sup>219</sup> Eine quantitative Auswertung ist daher bei der ABC-Methode nicht möglich. Wie auch auf der linken Seite der Abbildung dargestellt, wäre hierfür die PAP-Methode besser geeignet.

Wie im Färbeprotokoll beschrieben ist der erste Schritt das Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3%-iger Wasserstoffperoxidlösung. Dies ist aus folgendem Grund ausgesprochen wichtig: Generell lässt sich in verschiedenen Zellen eine Aktivität der endogenen Peroxidase nachweisen, die bei ungenügender Blockade eine Farbreaktion katalysiert, die von der spezifischen Färbung nicht zu unterscheiden ist und damit zur unspezifischen Hintergrundfärbung beiträgt. Zu diesen Zellen gehören Erythrozyten, Muskelzellen, Granulozyten und Monozyten. Katalase, ein verwandtes Enzym, wurde vor allem in Leber- und Nierenzellen gefunden.<sup>220</sup> Diese Enzyme müssen unbedingt vor der Färbereaktion blockiert werden. Diese Blockierung kann, wie beschrieben, mit Wasserstoffperoxid in Methanol durchgeführt werden. Gelegentlich kann die Wasserstoffperoxid-Blockade aber das Antigen zerstören. Um das zu verhindern, könnte die Blockierung erst nach dem Einsatz des primären Antikörpers vorgenommen werden.<sup>216</sup> In den vorliegenden Analysen

waren die Antigene jedoch sehr stabil, sodass dem Standardprotokoll gefolgt werden konnte.

Genauso verhält es sich mit endogenem Biotin.<sup>221</sup> Dieses ist in hoher Konzentration in der Niere, Leber und Nebenniere, u. U. aber auch im erythropoetischen Knochenmark, vorhanden. Da in dieser Studie lediglich Strukturen im Bereich des Mittelohrs untersucht werden, ist dies für die vorliegende Arbeit bedeutungslos, da Kreuzreaktionen ausschließlich im gut separierten Knochenmark auftraten. Eine mögliche Blockierung von endogenem Biotin mit unkonjugiertem Avidin war somit nicht nötig.<sup>222</sup>

Die Färbung mit dem Chromogen Diaminobenzidin ist die sensitivste unter den verfügbaren Möglichkeiten.<sup>216</sup> Das Resultat ist eine permanente Färbung mit gutem Kontrast. Diese kann jedoch noch weiter intensiviert werden: Dafür kann Nickel oder Kobalt verwendet werden, um mit dem DAB-Reaktionsprodukt zu interagieren.<sup>216,223</sup>

Als Optimierungsmöglichkeit hätte Nickelchlorid zur DAB-Lösung hinzugegeben werden können, damit ein schwarzes Produkt bei der Reaktion entsteht. Das führt zu einem höheren Kontrast, was vor allem für Schwarz-Weiß-Fotografien, die aber in dieser Arbeit nicht erstellt wurden, nützlich sein kann.<sup>214</sup>

Bezüglich der Einbettung gibt es auch Vor- und Nachteile zwischen den Kryostat-Gefrierschnitten und den Paraffin-eingebetteten Schnitten. Bei der Fixierung der Paraffinschnitte werden Antigene zerstört und somit die Antigenität reduziert, jedoch ist der morphologische Erhalt der Gewebestrukturen weitaus besser als bei Kryostat-Schnitten. Bei der Herstellung dieser Schnitte kann trotz hoher Sorgfalt und gutem technischen Geschick die Morphologie im Vergleich schlechter erhalten werden.<sup>214</sup> So kann es zu sog. artifiziellen Reaktionen kommen, also diffusen Anfärbungen, die z. B. durch eine Ansammlung von AK-Mischungen in Gewebefalten oder eingerollten Schnitträndern zustande kommt. Teilweise finden sich solche Artefakte auch aufgrund von Quetschungen, die beim Schneiden entstanden sind, oder aufgrund der zum Teil schlechten Haftung der Gewebeschnitte auf dem Objektträger. Auch unabhängig von der Problematik der artifiziellen Reaktionen kann es beim Herstellen der Gefrierschnitte zu Verschiebungen oder zum Abreißen von Strukturen kommen,

die dann bei den untersuchten Schnitten in einer falschen, nicht physiologischen Lage dargestellt werden. Solche Fehler sind trotz größter Sorgfalt kaum zu vermeiden. Auch die Entkalkung ist dem Erhalt der optimalen Gewebestruktur nicht förderlich, weshalb ein sehr schonendes Entkalkungsprotokoll zur Anwendung kam.

Potentielle Optimierungsmöglichkeiten sind eine identische Inkubationszeit bei gleichbleibender Optimaltemperatur und eine möglichst kurze Zeitspanne zwischen Herstellung der Schnitte, deren Färbung und der Auswertung. Mögliche Fehlerquellen wie unterschiedliche Konzentrationen der Antikörper oder Pufferlösungen, gering abweichende Inkubationszeiten oder Fehler beim Herstellen der Gefrierschnitte lassen sich trotz größter Bemühungen nicht gänzlich vermeiden. Daher werden Schnitte verschiedener Versuchstierindividuen in jeweils gleichen Versuchsansätzen gefärbt.

In Zusammenschau dieser Vor- und Nachteile erschien die gewählte Methode am besten geeignet, um das Vorkommen der ausgewählten Neurotransmitter oder -peptide und deren exakte Lokalisation zu untersuchen. Dass daraus keine quantitativen Werte gezogen werden können, ist für diese Arbeit nicht relevant, da es um den qualitativen Nachweis ging.

## 4.2 Würdigung der spezifischen Peptide und Transmitter

Beide Transmitter des vegetativen Nervensystems, sowie alle untersuchten Neuropeptide NPY, SP und VIP konnten im Plexus tympanicus im Mittelohr der Wistar-Ratte nachgewiesen werden. Sie wurden außerdem in weiteren Strukturen des Ohrbereichs gefunden. Damit gibt diese Studie nicht nur einen Überblick über die Chemoarchitektur des Plexus tympanicus selbst, sondern auch über den benachbarten Bereich um das Mittelohr. Dies könnte im Hinblick auf mögliche weiterreichende Funktionen des Nervengeflechts auch außerhalb des Plexus per se wichtig sein.

SP war in netzartigen Faserverbänden um Gefäße unabhängig von deren Kaliber zu finden. Im umliegenden Muskel-, Fett- und Bindegewebe fanden sich vereinzelte Nervenfasern. Im Drüsenbereich wurde eine stärkere Färbung, v. a. an einer Talgdrüse, nachgewiesen. Ein dichtes Netz durchzog die Schleimhaut des äußeren Gehörgangs und den anulären Trommelfellansatz. Von dort breiteten sich Fasern bis in den Randbereich der Membrana tympani aus. Auf dem Promontorium konnten zahlreiche großkalibrige SP-ir Elemente gefunden werden, die dem Knochen auflagen. Apikal am und im Paukenhöhlenepithel fanden sich kleinere *beaded* Nervenfasern mit perlschnurartig aneinandergereihten Boutons. Im restlichen Anteil der Mittelohrschleimhaut wurden vereinzelte SP-ir Varikositäten nachgewiesen, aber keine auffälligen SP-ir Faserzüge. Im knöchernen Bereich um das Innenohr fanden sich viele SP-ir Fasern; auch in der Stria vascularis konnten netzartige und isolierte SP-ir Strukturen in einer bestimmten Anordnung beobachtet werden. Das Corti-Organ war SP-negativ. In den Bogengängen fanden sich positive Elemente basal der Haarzellen der Cristae ampullares. In den Ganglien und Nerven im Innenohrbereich konnte keine SP-IR nachgewiesen werden. Im restlichen Ohrbereich ließen sich einige SP-ir Nervenfasern in größeren Nerven und vereinzelt Nervenzellperikaryen in Ganglien identifizieren (s. Abschnitt 3.1.3).

SP-ir Nervenzellperikaryen wurden in einer Studie von Ylikoski und Panula<sup>210</sup> in beiden sensorischen Ganglien des N. glossopharyngeus gefunden, welche den



Ursprung der hier nachgewiesenen SP-positiven Nervenfasern in der Mittelohrschleimhaut und im N. tympanicus darstellen könnten. Funktionell werden eine Beteiligung bei der Belüftung des Mittelohrs und der neurogenen Inflammation diskutiert.<sup>224</sup> SP spielt eine Rolle in der Ödembildung, Mastzellausschüttung und dem damit verbundenem Histaminanstieg, in der Leukozytenaktivierung, Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität.<sup>159,175</sup> Solche Effekte wurden in anderen Bereichen, wie z. B. der Schleimhaut der Atemwege, bereits nachgewiesen und lassen vermuten, dass SP im Mittelohr eine ähnliche Funktion einnimmt.<sup>6</sup> In Knockout-Studien, bei denen die Expression des NK1-Rezeptors verhindert wurde, kam es zu einer niedrigeren proinflammatorischen Aktivität.<sup>225,226</sup>

Widemar et al.<sup>6</sup> zeigten in einer Studie über die autonome Innervation des Trommelfells bei Ratten, dass sich noradrenerge Fasern v. a. entlang von Blutgefäßen im Ansatzbereich und in der Pars flaccida des Trommelfells befinden. Gefäßbegleitende SP-, VIP- und Enkephalin-ir Strukturen konnten in den Randbereichen der Pars flaccida nachgewiesen werden; wogegen keines dieser Peptide in der Pars tensa beobachtet werden konnte. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden solitäre Varikositäten von adrenergen Fasern am Trommelfell gefunden. Weiterhin wurden SP-ir Fasern im Randbereich des Trommelfells nachgewiesen. Diese Beschreibung deckt sich ebenfalls mit der von Uddman et al.<sup>211</sup> Die bei Widemar et al. nachgewiesenen VIP-ir Strukturen wurden in dieser Untersuchung nicht am Trommelfell selbst, sondern nur im Ansatzbereich gefunden.<sup>6</sup> Solche unterschiedlichen Ergebnisse könnten aufgrund interindividueller Unterschiede auftreten.

VIP wurde in perikapillären Boutons, in Gefäßwänden und gefäßbegleitend in den Havers- und Volkmann-Kanälen im Knochen nachgewiesen. Basal der Azini der Gl. parotidea und den Gl. ceruminiferae konnten VIP-ir Perikaryen und Fasern gefunden werden. Innerhalb großer Nerven waren einzelne VIP-positive Fasern vorhanden, so z. B. auch in einem Ast des N. vagus im äußeren Gehörgang. In der gesamten Mittelohrschleimhaut ließen sich zahlreiche VIP-ir Elemente identifizieren: Im Bereich des Promontoriums fielen prismatische bis

hochprismatisch Zellen auf, die v. a. apikal angefärbt wurden. Im apikalen Anteil konnten vesikelähnliche Abschnürungen gefunden werden, weshalb eine sekretorische Funktion dieser Zellen vermutet wird. Von einem tiefergelegenen Geflecht reichten VIP-ir Nervenfasern an die Basis dieser Zellen. In der restlichen Mittelohrschleimhaut wurden Faserstrukturen und Zellen, teilweise in ganglienartigen Ansammlungen, mit VIP-IR gefunden. Im Corti-Organ konnten an der Basis der Haarzellen VIP-positive Elemente beobachtet werden; genauso in der Stria vascularis, in den Bogengangampullen, dem Ggl. cochleare und in beiden Anteilen des N. vestibulocochlearis. In den anderen angeschnittenen Ganglien wurden keine VIP-ir Zellen gefunden (s. Abschnitt 3.1.1).

Das Vorkommen von VIP entlang von Gefäßen und im Bereich der Drüsen stimmt mit dem in der Einleitung bereits beschriebenen Vorkommen aus anderen Untersuchungen überein.<sup>53,109</sup> Funktionell sind für den Bereich des Mittelohrs besonders seine vasodilatatorische und sekretorische Wirkung von Interesse. Den Einfluss von VIP auf das Anschwellen der Nasenschleimhaut im Rahmen der cholinergen Innervation wurde bereits beschrieben.<sup>110</sup> Weitere Wirkungen sind eine Steigerung von Blutfluss und Gefäßpermeabilität und damit haben VIP-positive Nervenfasern einen möglichen Einfluss auf die Flüssigkeitssekretion im Mittelohr.<sup>227</sup>

Uddman et al.<sup>211</sup> fanden in einer Studie an Katzen und Meerschweinchen heraus, dass in der Schleimhaut der Cavitas tympani Nervenfasern verlaufen, die VIP, SP, Enkephalin oder *avian pancreatic polypeptide* enthalten, und dass diese eine sekretorische und vasomotorische Funktion haben könnten. In der Mehrzahl verlaufen sie zusammen mit Blutgefäßen.

In einer weiteren Studie untersuchten Uddman et al.<sup>35</sup> das Trommelfell und die Mittelohrschleimhaut der Ratte mit einer Kombination aus Immunocytochemie und retrograder Tracer-Studie. Dabei wurden Nervenfasern identifiziert, die NKA, CGRP oder SP enthielten. Diese kamen sowohl in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen vor, jedoch auch unabhängig von diesen in der Mittelohrschleimhaut. Außerdem wurden Faserzüge in der Pars flaccida des Trommelfells nachgewiesen. Eine hohe Anzahl wurde im Ansatzbereich des Trommelfells beschrieben.<sup>35</sup> Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen

der SP-ir Fasern in der vorliegenden Untersuchung. Gerade die Häufung im ansatznahen Bereich des Trommelfells war auffällig. SP-ir Fasern bildeten ein dichtes Netz in diesem Bereich, welches auch in die äußeren Anteile der Membrana tympanica ausstrahlte. Mit Ausnahme von DBH, dem Leitenzym für Noradrenalin, wurden keine anderen der untersuchten Botenstoffe am Trommelfell selbst detektiert.

Widemar et al.<sup>6</sup> beschrieben SP und VIP in der Pars flaccida und vermuteten einen Einfluss dieser beiden Peptide auf die Ödemproduktion und möglicherweise auf die Entstehung einer Mittelohrentzündung bzw. der zugehörigen Symptome. Goldie et al.<sup>224</sup> wiesen nach, dass SP, VIP und Acetylcholin eine Steigerung der Permeabilität der Gefäße im Mittelohr hervorrufen. Damit spielen sie eine entscheidende Rolle am Beginn einer Entzündungsreaktion und der Produktion von Sekret im Mittelohr im Rahmen einer Otitis media. Diese Erkenntnisse könnten zukünftig einen klinischen Nutzen haben: Ein SP-Antagonist konnte unter experimentellen Bedingungen in den Atemwegen bei Meerschweinchen einen Permeabilitätsanstieg und die Kontraktion der glatten Muskulatur verhindern.<sup>228</sup> Hinweise auf eine derartige Funktion gibt ebenfalls eine Studie von Newby et al.<sup>229</sup>, durch die gezeigt werden konnte, dass durch einen SP-Antagonisten die SP-induzierte Vasodilatation am Unterarm abgeschwächt werden kann. Dieser Aspekt wurde jedoch nicht weiter verfolgt; aktuelle Forschungen von SP-Antagonisten befassen sich überwiegend mit deren Wirkung in der Schmerztherapie oder als Antiemetikum.<sup>230,231</sup>

NPY-IR zeigte sich in kleinen Boutons um Kapillaren und in umfangreichen Geflechten um große Gefäße. Entlang der Blutgefäße zogen NPY-ir Nervenfasern durch Knochenkanäle bis in die Cavitas tympani. Dort fanden sich in der gesamten Mittelohrschleimhaut lange Faserverläufe, Nervengeflechte, apikal aufliegende Elemente oder größere Strukturen direkt auf dem Knochen. Lange Faserverläufe konnten auch im Innenohrbereich und in beiden Anteilen des N. vestibulocochlearis nachgewiesen werden. Zum Ggl. cochleare zogen NPY-ir Nervenfasern; im Ganglion gab es keine spezifische Anfärbung. In anderen Ganglien wurden vereinzelt NPY-positive Zellkörper gefunden. In

großen Nerven konnten NPY-ir Nervenfasern markiert werden (s. Abschnitt 3.1.2).

Eine Studie von Uddman et al.<sup>212</sup> unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Diese Autoren konnten NPY-ir Nervenfasern mit oder ohne Assoziation zu Blutgefäßen in der Mittelohrschleimhaut von Katzen und Meerschweinchen beobachten. Auch in der Tuba auditiva konnten NPY-ir Nervenfasern mit Varikositäten nachgewiesen werden.

Ein Teil der NPY-ir Nervenfasern soll seinen Ursprung im Ggl. cerviale superius besitzen, was das Vorkommen von NPY in adrenergen Fasern nahelegt.<sup>212</sup> Seine vasokonstriktorische Wirkung könnte auch gemeinsam mit Noradrenalin an der Regulation des Blutflusses im Mittelohr beteiligt sein und weiterhin Einfluss auf die Drüsensekretion haben.<sup>210</sup> Zu den NPY-ir Neuronen, die innerhalb des Plexus tympanicus regelmäßig vorkommen, wurden in der vorliegenden Literatur keine Angaben gemacht.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben ist der prinzipielle Bau des vegetativen Plexus tympanicus schon lange bekannt. Über die Nn. caroticotymplici erreichen sympathische Fasern die Cavitas tympani. Der N. tympanicus besitzt sensible und präganglionäre parasymphatische Fasern. Es wird vermutet, dass das ANS in der Schleimhaut der Cavitas tympani an der Regulation des Blutflusses, des mukoziliären Systems und der Sekretion von Drüsen beteiligt ist.<sup>209</sup>

In der vorliegenden Studie wurde die adrenerge bzw. sympathische Systemkomponente durch DBH-IR und die cholinerge bzw. parasymphatische Systemkomponente durch ChAT-IR dargestellt.

In den Gefäßen fanden sich subendotheliale ChAT-ir Varikositäten. ChAT-IR zeigte sich an den motorischen Endplatten und die angeschnittenen Nerven waren - wohl aufgrund des langsamen Transports von ChAT - allgemein dunkler gefärbt. In den Ganglien konnte eine Vielzahl von Nervenzellperikaryen angefärbt werden. ChAT-ir Elemente waren basal an den Drüsenzellen der Gl. parotidea, in Talgdrüsen und der Schleimhaut des äußeren Gehörgangs lokalisiert. Auf dem

Promontorium breiteten sich die cholinergen Fasern sowohl apikal am Epithel als auch direkt auf dem Knochen aus. Im restlichen Mittelohrbereich konnten ChAT-ir Fasern v. a. in Begleitung von Gefäßen gefunden werden. Viele nervale Strukturen im Innenohrbereich waren ChAT-ir; genauso wiesen Elemente in den Bogengängen und der Stria vascularis ChAT-IR auf (s. Abschnitt 3.1.5).

In Untersuchungen des vegetativen Nervensystems im Mittelohr der Katze konnten Ganglien mit AChE-Aktivität verteilt im Plexus tympanicus nachgewiesen werden.<sup>232</sup> Die Ganglienzellen im menschlichen Mittelohr waren v. a. an den Verzweigungen des N. tympanicus auf dem Promontorium verteilt.<sup>233</sup> AChE kann sowohl präsynaptisch in präganglionären sympathischen und parasymphatischen Terminalen als auch postsynaptisch vorhanden sein. Ebenso konnten Interneurone des Plexus tympanicus dieses Enzym exprimieren. Mit parasymphatischen Nerven waren die Neuropeptide VIP und SP assoziiert.<sup>207,234</sup>

DBH-ir Varikositäten konnten in den Gefäßwänden v. a. in der Adventita gefunden werden. In der Mittelohrschleimhaut verliefen adrenerge Fasern in unmittelbarer Nähe zu Gefäßästen. Auf dem Promontorium konnten DBH-ir Nervenfasern und Perikaryen basal am Knochen angefärbt werden; teilweise wurden kleine ganglienartige Ansammlungen identifiziert. Im äußeren Gehörgang und zwischen den Drüsen konnte ein feines DBH-ir Geflecht gefunden werden. Am Ansatz des Trommelfells verdichtete sich das DBH-ir Netz und breitete sich in den ansatznahen Bereich auch auf dem Trommelfell aus. Kleine Nerven sowie einzelne Nervenfasern in großen Nervenstämmen färbten sich spezifisch an. In den Ganglien wurden nur vereinzelt DBH-ir Zellen markiert. Besonders im Knochen um das Innenohr, in der Stria vascularis und den Bogengangampullen konnten DBH-ir Elemente nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.1.4).

Der Ursprung der adrenergen Fasern mit varikösen Verdickungen liegt im Ggl. cervicale superius.<sup>211</sup> In sympathischen Fasern kommt NPY vor, welches vermutlich die vasokonstriktorisches Effekte von Noradrenalin verstärkt.<sup>234</sup>

Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigt, dass mehrere Ganglien und Nerven in den Bereich des Mittelohrs projizieren und eine große Anzahl von

Neuropeptiden an der Innervation der Mittelohrschleimhaut und des Trommelfells beteiligt sind.<sup>35</sup>

Ganz besonders interessant ist die Tatsache, dass im Plexus tympanicus zahlreiche Ganglien und solitäre Neurone beobachtet werden können, die aufgrund der Verschiedenartigkeit der enthaltenen Transmitter für ein integratives Kontrollsystem in diesem Netzwerk sprechen. Aufgrund der Anforderungen an eine ausgezeichnete Homöostase der Cavitas tympani im Hinblick auf die Druckverhältnisse, die damit verbundene Sekretionstätigkeit der Schleimhäute sowie die mechanische Konsistenz von Schleimhäuten und Trommelfell, die für die Konstanthaltung der Höreindrücke auch bei wechselnden Umwelteinflüssen essentiell ist, bietet dieses integrative Kontrollsystem alle notwendigen Voraussetzungen. Keinesfalls dient der Plexus tympanicus *nur* der geradlinigen Passage von sympathischen und parasymphatischen Bahnen zum Ganglion oticum.

### 4.3 Zusammenspiel der untersuchten Systeme

In dieser Studie wurden Parallelserien mit jeweils einem Primär-AK gefärbt, der gegen ein Neuropeptid oder gegen ein Leitenzym für die Synthese von Noradrenalin oder Acetylcholin, den Transmittern des vegetativen Nervensystems, gerichtet war. Es fand eine qualitative Auswertung jedes einzelnen Botenstoffsystems statt. Im Kapitel 3.2 wurden Übersichtsskizzen erstellt, welche das Vorkommen der jeweiligen Transmitter und Peptide darstellen. Dabei wurden für die jeweiligen Botenstoffe unterschiedliche Farben benutzt und für das beobachtete Vorkommen ein Punkt an der jeweiligen Position eingefügt. Diese Skizzen wurden in verschiedenen Kombinationen zusammengesetzt, um das Zusammenspiel der untersuchten Systeme zu analysieren. Dabei ließen sich Übereinstimmungen finden, die eine Koexistenz in bestimmten Bereichen des Plexus tympanicus belegen, jedoch eine Kolokalisation in individuellen Neuronen nicht sicher nachweisen. Diesen Nachweis können nur immunocytochemische Doppelfärbungen erbringen. Weiterhin wäre eine Kombination einer Tracer-Studie mit Immunocytochemie möglich, um die Einbindung in unterschiedliche Hirnnervensysteme bzw. Ausgangssysteme zu analysieren.

Anhand des eingezeichneten Verteilungsmusters in den Übersichtsskizzen und der immunocytochemischen Befunde lassen sich folgende Kolokalisationen vermuten.

Die Transmitter des sympathischen und parasympathischen Systems fanden sich im Mittelohr vor allem auf dem Promontorium und in unmittelbarer Nähe zu den Gefäßästen. ChAT-ir Nervenzellperikaryen waren in großer Anzahl in Ganglien lokalisiert, wohingegen DBH-ir Zellen dort nur vereinzelt vorkamen.

ChAT und VIP wurden vor allem in den nervalen Strukturen im Innenohr in identischen Lokalisationen nachgewiesen: basal an den Haarzellen des Corti-Organs, in charakteristischer Anordnung in der Stria vascularis, in beiden Anteilen des N. vestibulocochlearis und im Ggl. cochleare.

ChAT und SP zeigten ein räumlich identisches Vorkommen im basalen Drüsenbereich und in Talgdrüsen. Im Innenohr wurden immunreaktive ChAT-

und SP-Elemente an den gleichen Strukturen in den Bogengängen und der Stria vascularis gefunden.

Das Vorkommen von DBH und NPY in dichten Geflechtern und in der Gefäßwand von großen Gefäßen war auffallend. Weitere lokalisatorische Übereinstimmungen zeigten sich in gefärbten Fasern kleiner Nerven nahe der Cavitas tympani und in großen Elementen bzw. ganglienartigen Ansammlungen direkt auf dem Knochen des Promontoriums.

An der motorischen Endplatte der angeschnittenen Muskulatur zeigten sich sowohl NPY-IR als auch ChAT-IR.

Weitere Lokalisationen im Ohrbereich wurden von neuronalen Elementen, die immunreaktiv gegenüber allen Antikörpern waren, nahezu gleichermaßen besiedelt. Alle genannten Stoffe wurden in der Schleimhaut der Cavitas tympani und des äußeren Gehörgangs, in großen Nervenstämmen, in und um Gefäßwände unterschiedlichen Kalibers sowie im umliegenden Binde- und Drüsengewebe nachgewiesen. Da sie an diesen Lokalisationen in so großer Anzahl vorkommen, ist es unmöglich aus den Ergebnissen dieser Studie explizite Strukturen an diesen Orten zu benennen, in denen verschiedene Transmitter und Peptide nebeneinander vorkommen.

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass Neuropeptide neben klassischen Neurotransmittern vorkommen.<sup>97</sup> Eine Auswertung des Zusammenspiels verschiedener Transmitter und Peptide war in dieser Studie nur begrenzt möglich. Die Ergebnisse decken sich jedoch weitestgehend mit denen aus bereits vorliegenden Untersuchungen. Die vermuteten Übereinstimmungen sind als klassische Kolokalisation an verschiedenen Organsystemen bei unterschiedlichen Spezies aus gegenwärtigen Studien bekannt.<sup>227,235</sup> Von den untersuchten Stoffen wurde Acetylcholin schon zusammen mit SP und VIP beschrieben<sup>53,107,207</sup>, Noradrenalin zusammen mit NPY<sup>140</sup>.

Sann et al.<sup>205</sup> führten immuncytochemische Untersuchungen am Ggl. mesentericum inferius von Meerschweinchen, Frettchen und Wistar-Ratten durch. Durch immuncytochemische Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass 83% der ChAT-ir Zellen auch NPY enthielten. Die Mehrheit der cholinergen Neurone enthielt auch Somatostatin oder VIP. Noradrenerge Neurone wurden in



dieser Studie mit monoklonalen Antikörpern untersucht, die gegen TH gerichtet waren. 22% der TH-ir Zellen waren auch immunreaktiv für NPY; 84% zeigten TH- und Somatostatin-IR. Außerdem wurde in dieser Analyse eine Kollokalisierung von VIP und NPY in TH-negativen Zellen festgestellt.<sup>205</sup>

Schemann, Schaaf et al.<sup>180</sup> untersuchten den Plexus myentericus von Meerschweinchenmägen mit immunocytochemischen Doppel- und Dreifachfärbungen. Hierbei enthielten 98% der VIP-ir Neurone auch NPY, während SP-IR niemals zusammen mit VIP- oder NPY-IR vorkam. Dafür waren alle SP-ir Neurone auch ChAT-positiv und auch unter dieser SP/ChAT-Population konnten noch Kombinationen mit weiteren Peptiden gefunden werden. Es wurde das Vorhandensein von mindestens zwei unterschiedlichen VIP/NPY-Neuronenpopulationen vermutet, da Subpopulationen entdeckt wurden, in denen ChAT und DBH oder Enkephalin und Stickstoffmonoxid-Synthase nachgewiesen wurden. In dieser Studie wurde eine Vielzahl von Antikörpern in Doppel- und Dreifachfärbungen verwendet und viele Neurone gefunden, die mehr als zwei Transmitter oder Peptide enthielten. Jedoch wurden auch ChAT-Neurone angefärbt, bei denen kein weiterer Überträgerstoff nachgewiesen werden konnte. Hier nahmen die Autoren an, dass es wahrscheinlicher ist, dass diese Neurone noch weitere Stoffe enthalten, die in ihrer Studie nicht untersucht wurden; das alleinige Vorkommen von nur einem Neurotransmitter sehen sie eher als unwahrscheinlich.<sup>180</sup>

In elektronenmikroskopischen Studien wurde gezeigt, dass in Nervenzellendigungen des peripheren vegetativen Nervensystems kleinere, klare Vesikel mit Acetylcholin neben *large dense-core vesicles*, die z. B. CGRP oder SP enthalten, vorliegen.<sup>204,236</sup>

In Ganglionzellen des Ggl. coeliacum der Wistar-Ratte wurde das Vorkommen von NPY und Somatostatin zusammen mit Noradrenalin nachgewiesen.<sup>237</sup>

Immer mehr Kombinationen werden entdeckt, so dass beim Nachweis von nur einem einzigen Transmitter oder Peptid eher angenommen wird, dass deren Partner noch nicht erforscht oder nachweisbar sind.<sup>180</sup> Die Dimension dieser Koexistenz von Neurotransmittern und Neuropeptiden erscheint gewaltig. Mit Blick auf den Plexus tympanicus muss nach den vorliegenden Befunden und im

Kontext mit den Kenntnissen aus anderen Komponenten des vegetativen Nervensystems von einem integrativen Netzwerk ausgegangen werden, das neben den bekannten Verknüpfungen mit dem Parotissystem und den sensiblen Bahnsystemen des Mittelohrs in zahlreiche regulatorische Prozesse insbesondere für die Hörphysiologie eingebunden ist.

#### 4.4 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde die Chemoarchitektur des Plexus tympanicus mittels immunocytochemischer Färbungen untersucht. Die untersuchten Transmitter und Peptide konnten in vielen Strukturen des Ohrbereichs – in großer Anzahl im Bereich des Plexus tympanicus – nachgewiesen werden. Eine derartige Studie, die diese Neurotransmitter und -peptide im gesamten Ohrbereich untersucht, ist nicht bekannt. Dabei stellt dies die Voraussetzung dar, um den Plexus tympanicus in seinem komplexen Netzwerk zu verstehen und eventuelle Verknüpfungen mit Regelkreisen zu identifizieren.

Durch eine detaillierte Analyse und den Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Botenstoffe wurden Übereinstimmungen gefunden, welche eine Kolo-kalisation mehrerer Substanzen vermuten lässt. Der genaue Nachweis von zwei Überträgerstoffen in einer spezifischen Struktur ist dennoch im Rahmen dieser Analyse nicht möglich. In Zusammenschau mit schon vorhandenen Untersuchungen eröffnet sich hier ein großes Gebiet weiterer Forschung.

Es kann angenommen werden, dass kaum ein Transmitter allein in einem Nerv vorkommt. Eher ist anzunehmen, dass eine Vielzahl an Substanzen entweder noch nicht erforscht wurde oder deren Nachweis noch nicht möglich ist. Um das Zusammenspiel der untersuchten Systeme zu erforschen, sind mindestens Doppel- oder Dreifachfärbungen nötig oder eine Kombination einer Tracer-Studie mit immunocytochemischer Technik. Im Vergleich zu den erwähnten Studien stellt die vorliegende Arbeit nur eine kleine Auswahl möglicher Substanzen dar, die im vegetativen Nervensystem vorkommen. Für die weitere Forschung muss das Spektrum um zusätzliche Überträgerstoffe erweitert werden.

Die Funktionen der Neurotransmitter und -peptide wurden in der Einleitung beschrieben. Gerade für die Aufklärung der Pathophysiologie der Otitis media stehen SP und VIP im Interesse der Forschung. Diese Substanzen haben steigernde Effekte auf die Durchblutung, Gefäßpermeabilität und Ödembildung. SP kann aktivierend auf die Mastzelldegranulation und dadurch Histaminausschüttung wirken und oben genannte Effekte wiederum verstärken. Beide Peptide wurden in der Pars flaccida des Trommelfells nachgewiesen, die

damit als potentielle Ursprungsregion einer Entzündungskaskade in der Entstehung einer Mittelohrentzündung diskutiert werden kann.<sup>6,224,228,238</sup> Die Pathophysiologie einer Erkrankung detailliert aufzuklären stellt eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dar. Möglicherweise bieten sich hier Ansatzpunkte für neue Therapien. Jedoch steht dieser Zweig aktuell nicht im Mittelpunkt der SP-Forschung.<sup>230,231</sup>

Die Jacobson-Anastomose beschreibt den Faserverlauf der Nervenfasern aus dem Ncl. salivatorius inferius bzw. dem Ggl. inferius über den N. tympanicus, welcher in den Plexus tympanicus einstrahlt. Daraus formiert sich der N. petrosus minor hauptsächlich mit parasymphatischen Fasern, der zum Ggl. oticum zieht und über die Anlagerung der Fasern an andere Nerven die Gl. parotidea als Zielorgan erreicht und innerviert. Dieser Verlauf über die Bildung eines Nervengeflechts mit anderen Nervenfasern und die Neuformierung, um das Ggl. oticum zu erreichen, erscheint aus anatomischer Sicht sehr komplex.<sup>233</sup> Diese Komplexität könnte darauf hinweisen, dass diese Fasern auch im Mittelohr eine Funktion haben, die sich gegenwärtig nicht eindeutig belegen lässt.

Die Bildung eines so umfangreichen Plexus aus verschiedenen Nervenursprüngen mit unterschiedlichen Qualitäten und das Vorkommen von Ganglienzellen im Mittelohr lässt darauf schließen, dass deren Funktionen ebenso vielfältig sind. Die Wirkung ist abhängig von den Botenstoffen der jeweiligen Nervenfasern. In der vorliegenden Arbeit wurden nur zwei Neurotransmitter und drei Neuropeptide untersucht und alle diese Stoffe ließen sich im Plexus tympanicus nachweisen. Vermutlich gibt es noch eine Vielzahl weiterer - bisher nicht untersuchter - Überträgerstoffe in diesem Geflecht, die einen funktionellen Einfluss haben. Gerade auch regulierende Effekte der Peptide untereinander sind anzunehmen.

Zur Anatomie, wie sie in der Einleitung beschrieben ist, gibt es inkonsistente Aussagen. In einer Studie von Çalgüner et al. wird die Verbindung von Fasern des Plexus tympanicus zum N. facialis in Frage gestellt, da sie bei den untersuchten Wistar-Ratten nicht nachgewiesen werden konnte. Mögliche Gründe hierfür können jedoch auch Fehler in der Methodik oder individuelle Unterschiede sein.<sup>239</sup> In einem 2019 veröffentlichten Buch über die „*Anatomy and*

*Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*“ wird die Anatomie des Ohrbereichs der Ratte beschrieben und eine Studie von Al-Hadithi und Mitchell zitiert.<sup>240</sup> Diese behaupten in ihrer Untersuchung, dass es in der Ratte keinen N. tympanicus gibt.<sup>241</sup> Der N. petrosus minor soll seine präganglionären parasymphatischen Fasern, die ihren Ursprung im Ncl. salivatorius inferius haben, aus dem Plexus tympanicus erhalten. Eine Verbindung über einen N. tympanicus zwischen dem N. glossopharyngeus und dem Plexus tympanicus soll es bei der Ratte jedoch nicht geben. Verbindungen zwischen dem Ggl. oticum und Hirnnerven würde es lediglich zum VII. HN geben. Möglich wären entweder ein extratympanischer Nervenast oder verbindende Fasern zwischen dem N. facialis und dem N. glossopharyngeus. Auch das Vorhandensein des N. petrosus superficialis minor, wie er beim Menschen bekannt ist, wird in Frage gestellt. Diese Aussagen stehen Erkenntnissen aus anderen Studien gegenüber.

Insbesondere konnte Jingyuan Yim in ihrer Dissertation eindeutig den N. tympanicus durch Tracerstudien demonstrieren.<sup>242</sup> Weijnen et al.<sup>9</sup> haben eine ausführliche Ausarbeitung der Anatomie der Nerven in und um die Cavitas tympani veröffentlicht. Hier wurden Wistar-Ratten untersucht und der Verlauf des N. tympanicus sehr genau beschrieben. Auch Untersuchungen der Neurotransmitter im Ohrbereich wiesen auf das Vorhandensein einer Verbindung zwischen dem Ggl. inferius und der Mittelohrschleimhaut hin: Ylikoski et al.<sup>210</sup> fanden SP-ir Perikaryen in beiden Ganglien des N. glossopharyngeus und SP-ir Nervenfasern im Plexus tympanicus. Dies spricht dafür, dass es eine Verbindung zwischen dem N. glossopharyngeus und dem Plexus tympanicus geben muss. Solche Verbindungen zwischen der Mittelohrschleimhaut bzw. der Membrana tympanica und dem Ggl. cervicale superius bzw. den Ganglien des N. glossopharyngeus wurden mit einem retrograden Tracer nachgewiesen.<sup>243</sup> Aus diesen Gründen kann angenommen werden, dass die anatomischen Verhältnisse mit denen aus dem einleitenden Kapitel übereinstimmen.

Solche Studien zeigen, dass es selbst in der Topographie dieser Strukturen noch uneinheitliche Ergebnisse gibt und sich auch in Zukunft mit verbesserten oder kombinierten Methoden neue Erkenntnisse ergeben können.<sup>16</sup> Außerdem wird deutlich, dass die Anatomie von verschiedenen Versuchstieren und dem

Menschen nicht unbedingt identisch ist und nicht alle Beobachtungen übertragen werden können. Genauso können die anatomischen Strukturen auch innerhalb einer Art interindividuell so stark voneinander abweichen, dass nicht immer einheitliche Ergebnisse erzielt werden. Eine Kombination aus Immunocytochemie mit mikroskopischer Auswertung und einer mikrochirurgischen Analyse könnte weitere Erkenntnisse bringen.

Die vorliegende Arbeit kann als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen, die den Fokus entweder auf die Anatomie des Mittelohrbereichs oder das Vorkommen und die Koexistenz unterschiedlicher Transmitter und Peptide und deren Wirkung legen. Weitere physiologisch-pharmakologische Studien könnten die Funktion des Plexus tympanicus in einem übergeordneten Gefüge analysieren. Aufbauend auf neuen Erkenntnissen über die Wirkung verschiedener Peptide und einer aufgeklärten Pathophysiologie könnten erneut therapeutische Ansätze verfolgt werden.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Der Plexus tympanicus ist ein komplex aufgebautes Nervengeflecht in der Mukosa des Mittelohrs. Aus anatomischen Studien ist bekannt, dass zuführende und wegführende Verbindungen unterschiedlichen Hirnnerven und sympathischen Bahnen angehören. Insbesondere werden parasympathische und sympathische Innervationssysteme beschrieben und damit stellt der Plexus tympanicus einen Plexus des vegetativen Nervensystems dar.

Bisher fehlen detaillierte Analysen über die Chemoarchitektur dieses Plexus. In der vorliegenden Studie soll das Vorhandensein unterschiedlicher Neurotransmitter und -peptide untersucht werden, um Vorstellungen über die Funktion dieses komplexen Geflechts zu entwickeln.

Es wurden immunocytochemische Färbungen an sechs Parallelserien von Kryostatschnitten durchgeführt. Dabei wurden Primärantikörper benutzt, die gegen Cholinacetyltransferase (ChAT), Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH), Substanz P (SP), Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) gerichtet waren. Dadurch konnten sympathische Nervenfasern durch den Nachweis von DBH als Leitenzym für die Noradrenalinsynthese analysiert werden; parasympathische Strukturen konnten durch Anti-ChAT-AK, das Leitenzym für die Acetylcholinsynthese, differenziert werden.

Alle genannten Neurotransmitter und -peptide konnten in den Mittelohrschnitten nachgewiesen werden. Dabei wurden sie in folgenden Lokalisationen gefunden: VIP wurde vor allem in perikapillären Boutons und Gefäßwänden im gesamten Ohrbereich sowie basal im Drüsenbereich des Meatus acusticus externus nachgewiesen. In der Mittelohrschleimhaut war VIP weit verbreitet und gerade im Bereich des Promotoriums waren einzelne Zellen intensiv angefärbt, die Zeichen sekretorischer Aktivität trugen. SP wurde vor allem in netzartigen um Gefäße gelagerten Fasern und in *beaded* Nervenfasern in der Mittelohrschleimhaut gefunden. Auch im Bereich der Drüsen, vor allem an Talgdrüsen des äußeren Gehörgangs, wurde SP nachgewiesen. NPY-IR zeigte sich in Geflechten um große Gefäße, an motorischen Endplatten der benachbarten Muskulatur, in der

Mittelohrschleimhaut, in Nervenstämmen, Ganglien des Mittelohrbereichs und weniger dicht an Drüsen. ChAT-ir Strukturen sind direkt auf dem Knochen aufliegend in der Mittelohrschleimhaut, gefäßbegleitend an motorischen Endplatten und basal an Drüsenzellen vorhanden. ChAT-ir Nervenzellperikaryen wurden in großer Zahl in Ganglien gefunden, außerdem waren die Nerven allgemein leicht positiv. DBH-ir Strukturen wurden zwischen den Drüsen, in den Gefäßwänden der Arterien im Mittelohrbereich und in Nervenstämmen nachgewiesen. Einige DBH-ir Nervenzellperikaryen befanden sich in den Ganglien innerhalb des Mittelohrbereichs und der zuführenden Hirnnerven. Auch in der Mittelohrschleimhaut wurden Perikaryen, teilweise ganglienartig organisiert, gefunden. In verschiedenen Strukturen im Innenohrbereich konnten alle Neurotransmitter und -peptide in unterschiedlich starker Tingierung nachgewiesen werden.

Anhand des Verteilungsmuster lassen sich Kollokalisierungen der Neuropeptide mit noradrenergen und cholinergen Neuronen vermuten, die bereits in anderen Studien für verschiedene Komponenten des vegetativen Nervensystems beschrieben wurden. Anhand der vorliegenden Analysen wurden Lokalisationsübereinstimmungen von ChAT und VIP, ChAT und SP und DBH und NPY gefunden.

Diese Studie soll als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Insbesondere für das Verständnis von Funktionen und Pathologien des Nervengeflechts bedarf es weiterer Forschung. Die vorliegende Arbeit weist eindeutig nach, dass der Plexus tympanicus ein integratives System darstellt, das im Gegensatz zu früheren Vorstellungen einer reinen Durchgangsorganisation alle Voraussetzungen für ein Kontrollsystem erfüllt.



## 5.2 Zusammenfassung in englischer Sprache

The tympanic plexus is a nervous network located in the mucosa of the tympanic cavity. It is formed by nerve fibers of cranial nerves and sympathetic branches originating in the superior cervical ganglia. The structure of the tympanic plexus is complex and highly variable. According to various studies, the tympanic plexus is composed of parasympathetic and sympathetic components and, therefore, represents a plexus of the vegetative nervous system.

So far, detailed analyses of the chemoarchitecture of this plexus are missing. In the present study, the occurrence and location of different neurotransmitters and peptides were analysed in order to develop concepts on the function of this complex network.

Primary antibodies directed against choline acetyltransferase (ChAT), dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH), substance P (SP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and neuropeptide Y (NPY) were used for immunocytochemical stainings of six parallel series of cryostat sections. DBH is the lead enzyme for noradrenaline synthesis and allows the detection of sympathetic nerve fibers; parasympathetic nerve fibers could be stained with antibodies directed against ChAT which acts as the leading enzyme for acetylcholine synthesis.

The neurotransmitters and peptides were found in the following locations of the middle ear: VIP immunoreactivity was demonstrated in pericapillary boutons and in walls of blood vessels in the entire region of the ear and on the basal side of the glands of the external auditory meatus. Furthermore, VIP was found most abundantly in the mucosa of the promontory of the middle ear. Some single cells were intensely stained and their appearance suggests secretory activity. SP containing fibers were mainly found in fibers reticularly arranged around blood vessels and in beaded nerve fibers located in the middle ear mucosa. SP immunoreactivity was also detected in the area of the glands, especially on the sebaceous glands of the external auditory meatus. NPY immunoreactive structures were found around large blood vessels, in the middle ear mucosa, in trunks of major nerves and in several ganglia. ChAT immunoreactive formations are located attached to the bone in the mucosa of the middle ear and basally of

glandular cells. Immunohistochemical staining with anti-ChAT-antibodies generally marked nerve structures slightly positive. ChAT immunoreactive nerve cell perikarya were found in large numbers in ganglia within and outside of the tympanic plexus. DBH immunoreactive structures have been detected between the glands, in the arterial walls, in nerve trunks and various ganglia. Perikarya with DBH immunoreactivity were located in the middle ear mucosa, some of them organized in ganglia. All neurotransmitters and peptides investigated could be detected in various structures of the inner ear with varying abundance of staining.

Colocalizations of neuropeptides within noradrenergic and cholinergic neurons have already been described. Based on the distribution pattern in the present study, colocalizations of ChAT and VIP, ChAT and SP and DBH and NPY can be assumed.

The results of this study may be used as a basis for further research on the functions and pathologies of the tympanic plexus. The present work clearly demonstrates that the tympanic plexus serves for more than just a passage of nerves. It is rather an integrative system which fulfills all requirements for a complex control system.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. Wörthsee: BioMed Verlag; 1995.
2. Timmermans P. *Social behaviour in the rat*. [Dissertation]. Nijmegen: Katholieke Universiteit te Nijmegen; 1978.  
[https://repository.ubn.ru.nl/bitstream/handle/2066/148621/mmubn000001\\_025236105.pdf](https://repository.ubn.ru.nl/bitstream/handle/2066/148621/mmubn000001_025236105.pdf). Accessed October 3, 2019.
3. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012.
4. Drenckhahn D, ed. *Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. 16., völlig neu bearb. Aufl. München [u.a.]: Urban & Schwarzenberg; 2004. Anatomie; 2.
5. Schaffer J. *Die Hauptdrüsenorgane der Säugetiere: mit besonderer Berücksichtigung ihres histologischen Aufbaues und Bemerkungen über die Proktodäaldrüsen*. München: Urban & Schwarzenberg; 1940.
6. Widemar L, Hellström S, Schultzberg M, Stenfors LE. Autonomic innervation of the tympanic membrane. An immunocytochemical and histofluorescence study. *Acta Oto-Laryngologica*. 1985;100(1-2):58-65.  
doi:10.3109/00016488509108588.
7. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
8. Maynard RL, Downes N. The Ear. In: Maynard RL, Downes N, eds. *Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research*. London, U.K.: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2019:293-302.
9. Weijnen J, Surink S, Verstralen M, Moerkerken A, Bree G de, Bleys R. Main trajectories of nerves that traverse and surround the tympanic cavity in the rat. *J Anatomy*. 2000;197(2):247-262. doi:10.1046/j.1469-7580.2000.19720247.x.
10. Boenninghaus HG, Lenarz T. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. 13. Aufl. Heidelberg: Springer; 2007. Springer-Lehrbuch.
11. Hellström S, Salén B, Stenfors LE. Anatomy of the Rat Middle Ear: A Study Under the Dissection Microscope. *Acta anatomica*. 1982;112:346-352.  
Accessed April 9, 2019.
12. Kuijpers W, van der Beek JMH, Jap PHK, Tonnaer ELG. The structure of the middle ear epithelium of the rat and the effect of Eustachian tube obstruction. *Histochem J*. 1984;16(8):807-818. doi:10.1007/BF01002787.
13. Candiollo L, Guglielmone R. Further observations concerning the proprioceptive innervation of the tensor tympani muscle. *Anat Anz*. 1969;125(2):161-165.
14. Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R. *Waldeyer: Anatomie des Menschen*. 17. Aufl. s.l.: Walter de Gruyter GmbH Co.KG; 2009. Accessed April 23, 2018.
15. Holz K. *Vergleichende anatomische und topographische Studien über das Mittelohr der Säugetiere*. [Inauguraldissertation]. Berlin: Tierärztliche Hochschule Berlin; 1931. Accessed April 23, 2018.

16. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;117(5):438-447. doi:10.1016/s0194-5998(97)70011-1.
17. Daniel HJ, Fulghum RS, Brinn JE, Barrett KA. Comparative anatomy of eustachian tube and middle ear cavity in animal models for otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1982;91(1 Pt 1):82-89. doi:10.1177/000348948209100118.
18. Turkewitsch BG. Comparative anatomical investigation of the osseous labyrinth (vestibule) in mammals. *American Journal of Anatomy.* 1935;57:503-543. Accessed April 23, 2018.
19. McRoberts DD. A study of the development of the cochlea and cochlearis in the fetal albino rat. *J. Morphol.* 1934;56(2):243-265. doi:10.1002/jmor.1050560204.
20. Firbas W, Sinzinger H. Über das Ganglion spirale der Ratte. *Cells Tissues Organs.* 2004;79(1):36-43. doi:10.1159/000143621.
21. Hyrtl J. *Vergleichend-anatomische Untersuchungen über das innere Gehörorgan des Menschen und der Säugethiere.* [Mit neun Kupfertafeln]. Prag: Verlag von Friedrich Ehrlich; 1845. Accessed March 25, 2018.
22. Huggenberger S, Moser N, Schröder H, Cozzi B, Granato A, Merighi A. Hirnnerven. In: Huggenberger S, Moser N, Schröder H, Cozzi B, Granato A, Merighi A, eds. *Neuroanatomie des Menschen.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019:137-154. *Springer-Lehrbuch.*
23. Kanzara T, Hall A, Virk JS, Leung B, Singh A. Clinical anatomy of the tympanic nerve: A review. *WJO.* 2014;4(4):17. doi:10.5319/wjo.v4.i4.17.
24. Korf HW, Schiebler TH. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 111 Tabellen.* 10., vollst. überarb. Aufl. Heidelberg: Steinkopff; 2007.
25. Donaldson I. Surgical anatomy of the tympanic nerve. *J Laryngol Otol.* 1980;94(2):163-168.
26. Rosen S. The tympanic plexus: An Anatomic Study. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* 1950;52(1):15-18. doi:10.1001/archotol.1950.00700030034003.
27. Patestas MA, Gartner LP. *A textbook of neuroanatomy.* Malden, MA: Blackwell Publ; 2006.
28. Richard Marcin. Comparative cranial anatomy of rattus norvegicus and proechimys trinitatus. <https://www.baruch.cuny.edu/library/honorstheses/pdf/RichardMarcin.pdf>. Accessed October 3, 2019.
29. Lekakis GK. Philipp Friedrich Arnold, Ludvig Levin Jacobson and their contribution to head and neck anatomy. *J Laryngol Otol.* 2003;(117):28-31. Accessed November 19, 2019.
30. Rüdinger N. Die Anatomie der menschlichen Gehirnnerven für Studierende und Ärzte. <https://archive.org/details/dieanatomiederm00rdgoog/page/n13>. Accessed November 19, 2019.
31. Heitzmann C. Die descriptive und topographische Anatomie des Menschen: IV. Eingeweide, Topographie. V. Nervensystem. VI. Blut- und Lymphgefäß-System. Topographie. [Band 2]. <https://digi.ub.uni->

- heidelberg.de/diglit/heitzmann1885bd2/0154/image. Accessed November 19, 2019.
32. Frenckner P. Observations on anatomy of the tympanic plexus and technique of tympanosympathectomy. *AMA Arch Otolaryngol.* 1951;54(4):347-355. doi:10.1001/archotol.1951.03750100009002.
  33. Mitchell GAG, Learmonth J. *Anatomy of the Autonomic Nervous System.* Edinburgh and London: E. & S. Livingstone; 1953.
  34. Arslan M. The Innervation of the Middle Ear. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1960;53(12):1068-1074. doi:10.1177/003591576005301220.
  35. Uddman R, Grunditz T, Larsson A, Sundler F. Sensory innervation of the ear drum and middle-ear mucosa: retrograde tracing and immunocytochemistry. *Zeitschrift fr Zellforschung.* 1988;252(1):141-146. doi:10.1007/bf00213835.
  36. Ozveren MF, Türe U. The microsurgical anatomy of the glossopharyngeal nerve with respect to the jugular foramen lesions. *Neurosurg Focus.* 2004;17(2):E3. doi:10.3171/foc.2004.17.2.3.
  37. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018.
  38. Lang J. Neuroanatomie der Nn. opticus, trigeminus, facialis, glossopharyngeus, vagus, accessorius und hypoglossus. *Arch Otorhinolaryngol.* 1981;231(1):1-69. doi:10.1007/bf00465556.
  39. Allam AF. Transtympanic neurectomy in chronic recurrent parotid sialoadenitis. *J. Laryngol. Otol.* 1975;89(04):405-418. doi:10.1017/S0022215100080531.
  40. Porto AF, Whicker J, Proud GO. An anatomic study of the hypotympanic branch of Jacobson's nerve. *Laryngoscope.* 1978;88(1 Pt 1):56-60. doi:10.1002/lary.1978.88.1.56.
  41. Tekdemir İ, Asian A, Tüccar E, Çubuk HE, Elhan A, Deda H. An anatomical study of the tympanic branch of the glossopharyngeal nerve (nerve of Jacobson). *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* 1998;180(4):349-352. doi:10.1016/S0940-9602(98)80041-1.
  42. Miehle A, Stennert E, Arold R, et al. Chirurgie der Nerven im HNO-Bereich. *Arch Otorhinolaryngol.* 1981;231(1):89-449. doi:10.1007/BF00465558.
  43. Ludin VF. Übersicht Über die Neuroanatomie Des Ohres. *Acta Oto-Laryngologica.* 2009;45(3):207-214. doi:10.3109/00016485509118151.
  44. Kirsch J, Siegmund G, May CA, et al. *Taschenlehrbuch Anatomie. 2., überarbeitete Auflage.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2017.
  45. Ogawa T, Rutka J. The presence of ganglion cells in the human middle ear: a histological survey. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1999;540:38-41. doi:10.1080/00016489950181170.
  46. Böhm S. Vegetatives System. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, eds. *Pharmakologie und Toxikologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016:229-255. *Springer-Lehrbuch.*
  47. Beck M. Das autonome Nervensystem und seine neuroanatomischen und neurobiologischen Komponenten. *Osteopathische Medizin.* 2011;12(3):13-22. doi:10.1016/j.ostmed.2011.07.007.

48. Raju TNK. The Nobel Chronicles. *The Lancet*. 1999;353(9150):416. doi:10.1016/S0140-6736(05)75001-7.
49. Dale H. Nomenclature of fibres in the autonomic system and their effects. *J Physiol (Lond)*. 1934;80(Suppl):9P-22P.
50. Loewi O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch*. 1921;189(1):239-242. doi:10.1007/BF01738910.
51. Eccles JC, Fatt P, Koketsu K. Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J Physiol (Lond)*. 1954;126(3):524-562. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005226.
52. Hökfelt T, Elfvin LG, Elde R, Schultzberg M, Goldstein M, Luft R. Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(8):3587-3591. doi:10.1073/pnas.74.8.3587.
53. Lundberg JM, Anggård A, Fahrenkrug J, Hökfelt T, Mutt V. Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(3):1651-1655. doi:10.1073/pnas.77.3.1651.
54. Zilles K, Rehkämper G. *Funktionelle Neuroanatomie: Lehrbuch und Atlas*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. Springer-Lehrbuch. <https://books.google.de/books?id=BbepBgAAQBAJ>.
55. Sternberger LA. *Immunocytochemistry*. 3. ed. New York: Churchill Livingstone; 1986.
56. Leblanc G, Landis S. Development of choline acetyltransferase (CAT) in the sympathetic innervation of rat sweat glands. *J Neurosci*. 1986;6(1):260-265. doi:10.1523/JNEUROSCI.06-01-00260.1986.
57. Hein L. Alpha 2-adrenerge Rezeptoren: Molekulare Struktur und In-vivo-Funktion. *Z Kardiol*. 2001;90(9):607-612. doi:10.1007/s003920170107.
58. Euler U. A Sympathomometric Pressor Substance in Animal Organ Extracts. *Nature*. 1945;156(3949):18-19. doi:10.1038/156018b0.
59. Holtz P. Experimentelle Grundlagen der renalen und essentiellen Hypertonie. *Klinische Wochenschrift*. 1946;24-25(5-6):65-78. doi:10.1007/bf01734345.
60. Holtz P. Role of L-DOPA decarboxylase in the biosynthesis of catecholamines in nervous tissue and the adrenal medulla. *Pharmacol Rev*. 1959;11(2, Part 2):317-329.
61. Vogt M. The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J Physiol (Lond)*. 1954;123(3):451-481. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005064.
62. Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Zeitschrift für Zellforschung (Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie)*. 1965;65(4):573-596. doi:10.1007/BF00337069.
63. Purves D, Williams SM, eds. *Neuroscience*. 3. ed. Sunderland, Mass.: Sinauer; 2004.
64. Fuller RW. Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:31-55. doi:10.1146/annurev.pa.22.040182.000335.

65. Winkler H, Schmidt W, Fischer-Colbrie R, Weber A. Molecular Mechanisms of Neurotransmitter Storage and Release: A Comparison of the Adrenergic and Cholinergic Systems. In: Changeux JP, ed. *Molecular and cellular interactions underlying higher brain functions: Proceedings of the 9th Meeting of the International Neurobiology Society, held at the Abbaye royale de Fontevault (France), on September 1-4 1981*. Vol. 58. Amsterdam, New York: Elsevier Science; 1983:11-20. *Progress in Brain Research*; v. 58.
66. Boschmann M, Schroeder C, Christensen NJ, et al. Norepinephrine transporter function and autonomic control of metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5130-5137. doi:10.1210/jc.2002-020533.
67. Tanaka M. Emotional stress and characteristics of brain noradrenaline release in the rat. *Ind Health*. 1999;37(2):143-156. doi:10.2486/indhealth.37.143.
68. Hieble JP. Subclassification and nomenclature of alpha- and beta-adrenoceptors. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(2):129-134. doi:10.2174/156802607779318172.
69. Summers RJ, McMartin LR. Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem*. 1993;60(1):10-23. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb05817.x.
70. Bylund DB. alpha-2 Adrenergic Receptors. In: Limbird LE, ed. *The Alpha-2 adrenergic receptors*. Vol. 153. Clifton, N.J.: Humana Press; 1988:1-13. *The Receptors*.
71. Goldstein DS. Catecholamine Receptors and Signal Transduction. In: Goldstein DS, ed. *Catecholamines: Bridging basic science with clinical medicine*. Vol. 42. San Diego: Academic Press; 1998:379-390. *Advances in Pharmacology*; 42.
72. Böhm S. Adrenerge und noradrenerge Systeme. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016:117-121. *Springer-Lehrbuch*.
73. Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European Journal of Pharmacology*. 2000;405(1-3):397-406. doi:10.1016/S0014-2999(00)00569-0.
74. Kamal S, Lappin SL. *StatPearls: Biochemistry, Catecholamine Degradation*. Treasure Island (FL); 2019.
75. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:79-101. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734.
76. Larabee CM, Neely OC, Domingos AI. Obesity: a neuroimmunometabolic perspective. *Nat Rev Endocrinol*. 2019. doi:10.1038/s41574-019-0283-6.
77. Kong JY, Thureson-Klein ÅK, Klein RL. Are NPY and enkephalins costored in the same noradrenergic neurons and vesicles? *Peptides*. 1990;11(3):565-575. doi:10.1016/0196-9781(90)90060-I.
78. Böhm S. Cholinerge Systeme. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016:123-127. *Springer-Lehrbuch*.

79. Nachmansohn D. The Role of Acetylcholine in the Mechanism of Nerve Activity. In: Harris RS, Thimann KV, eds. *Vitamins and hormones: Advances in research and applications*. Vol. 3. New York: Academic Press; 1945:337-377. *Vitamins and hormones*; v. 3.
80. Kummer W, Lips KS, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(2):219-234. doi:10.1007/s00418-008-0455-2.
81. Karczmar AG. Brief presentation of the story and present status of studies of the vertebrate cholinergic system. *Neuropsychopharmacology*. 1993;9(3):181-199. doi:10.1038/npp.1993.81.
82. Greeff K. Cholinerge Erregungsübertragung und deren pharmakologische Beeinflussung. In: Brisse B, Bender F, eds. *Autonome Innervation des Herzens*. Heidelberg: Steinkopff; 1982:32-38.
83. Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci*. 2000;3(2):120-125. doi:10.1038/72059.
84. Rylett RJ, Schmidt BM. Regulation of the synthesis of acetylcholine. In: *Brain Research*. Vol. 98:161-166.
85. Ferguson SM, Blakely RD. The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Mol Interv*. 2004;4(1):22-37. doi:10.1124/mi.4.1.22.
86. Böhm S. Neurotransmission und Neuromodulation. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016:105-115. *Springer-Lehrbuch*.
87. Millar NS, Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):237-246. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.041.
88. Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology*. 2000;61(1):75-111. doi:10.1016/s0301-0082(99)00045-3.
89. Wess J, Liu J, Blin N, Yun J, Lerche C, Kostenis E. Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. *Life Sciences*. 1997;60(13-14):1007-1014. doi:10.1016/s0024-3205(97)00041-6.
90. Grando SA, Kawashima K, Wessler I. Introduction: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sciences*. 2003;72(18-19):2009-2012. doi:10.1016/S0024-3205(03)00063-8.
91. Scharrer E, Scharrer B. *Neuroendocrinology*. New York: Columbia University Press; 1963.
92. Bargmann W. Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Hypophyse. *Klinische Wochenschrift*. 1949;27(37/38):617-622. Accessed March 24, 2018.
93. Scharrer B. The Neuropeptide Saga. *American Zoologist*. 1990;30(4):887-895. <http://www.jstor.org.proxy.ub.uni-frankfurt.de/stable/pdf/3883446.pdf>. Accessed March 24, 2018.
94. Mains RE, Eipper BA. The Neuropeptides. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. [6th edition]. Philadelphia; 1999.



95. Pow DV, Morris JF. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience*. 1989;32(2):435-439. doi:10.1016/0306-4522(89)90091-2.
96. Turner AJ. *Neuropeptides and their peptidases*. Weinheim [u.a.]: VCH; 1987. Ellis Horwood series in biomedicine.
97. Hökfelt T, Millhorn D, Seroogy K, et al. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia*. 1987;43(7):768-780. doi:10.1007/BF01945354.
98. Said SI, Mutt V. Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur J Biochem*. 1972;28(2):199-204. doi:10.1111/j.1432-1033.1972.tb01903.x.
99. Mutt V, Said SI. Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur J Biochem*. 1974;42(2):581-589. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03373.x.
100. Carlquist M, Mutt V, Jörnvall H. Isolation and characterization of bovine vasoactive intestinal peptide (VIP). *FEBS Letters*. 1979;108(2):457-460. doi:10.1016/0014-5793(79)80587-6.
101. Carlquist M, McDonald TJ, Go VL, Bataille D, Johansson C, Mutt V. Isolation and amino acid composition of human vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Horm Metab Res*. 1982;14(1):28-29. doi:10.1055/s-2007-1018912.
102. Dimaline R, Reeve JR, Shively JE, Hawke D. Isolation and characterization of rat vasoactive intestinal peptide. *Peptides*. 1984;5(2):183-187. doi:10.1016/0196-9781(84)90204-3.
103. Nilsson A. Structure of the vasoactive intestinal octacosapeptide from chicken intestine. The amino acid sequence. *FEBS Letters*. 1975;60(2):322-326. doi:10.1016/0014-5793(75)80740-X.
104. Du BH, Eng J, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Yalow RS. Guinea pig has a unique mammalian VIP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985;128(3):1093-1098. doi:10.1016/0006-291X(85)91052-6.
105. Groneberg DA, Rabe KF, Wagner U, Fischer A. Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) im Atemtrakt: Physiologie und Pathophysiologie. *Pneumologie*. 2004;58(5):330-338. doi:10.1055/s-2004-818352.
106. Mutt V. Vasoactive intestinal polypeptide and related peptides. Isolation and chemistry. *Ann NY Acad Sci*. 1988;527:1-19. doi:10.1111/j.1749-6632.1988.tb26968.x.
107. Schutzberg M, Hökfelt T, Lundberg JM, Fuxe K, Mutt V, Said S. Distribution of VIP neurons in the peripheral and central nervous system. *Endocrinol Jpn*. 1980;27 Suppl 1:23-30. doi:10.1507/endocrj1954.27.supplement\_23.
108. Seifert E, Schadel A. Neuropeptide im Nervus facialis der Ratte. *Laryngorhinootologie*. 1993;72(4):193-196. doi:10.1055/s-2007-997883.
109. Riederer A, Knipping S, Fischer A, Unger J. Aktuelle immunhistochemische Ergebnisse zur Lokalisation von vasoaktiv

- intestinalem Polypeptid (VIP) in der Nasenschleimhaut des Menschen. *Laryngorhinootologie*. 1995;74(10):611-614. doi:10.1055/s-2007-997812.
110. Riederer A, Knipping S, Toleti B. Überlegungen zur Dynamik des Schwellgewebes der unteren Nasenmuschel des Menschen. *Laryngorhinootologie*. 2002;81(7):469-475. doi:10.1055/s-2002-33292.
  111. Baraniuk JN, Lundgren JD, Okayama M, et al. Vasoactive intestinal peptide in human nasal mucosa. *J Clin Invest*. 1990;86(3):825-831. doi:10.1172/JCI114780.
  112. Fahrenkrug J. Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacol Toxicol*. 1993;72(6):354-363. doi:10.1111/j.1600-0773.1993.tb01344.x.
  113. Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function. *Digestion*. 1979;19(3):149-169. doi:10.1159/000198339.
  114. Frandsen EK, Moody AJ. Lipolytic action of a newly isolated vasoactive intestinal polypeptide. *Horm Metab Res*. 1973;5(3):196-199. doi:10.1055/s-0028-1093951.
  115. Kerins C, Said SI. Hyperglycemic and glycogenolytic effects of vasoactive intestinal polypeptide. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1973;142(3):1014-1017. doi:10.3181/00379727-142-37165.
  116. Roberts GW, Woodhams PL, Bryant MG, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM. VIP in the rat brain: Evidence for a major pathway linking the amygdala and hypothalamus via the stria terminalis. *Histochemistry*. 1980;65(2):103-119. Accessed May 3, 2018.
  117. Rostene W. Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (vip). *Progress in Neurobiology*. 1984;22(2):103-129. doi:10.1016/0301-0082(84)90022-4.
  118. Lorén I, Emson PC, Fahrenkrug J, et al. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience*. 1979;4(12):1953-1976. doi:10.1016/0306-4522(79)90068-X.
  119. Melmed S, Jameson J. *Erkrankungen des Hypophysenvorderlappens und des Hypothalamus*. 19. Auflage. New York, NY, Berlin, Stuttgart: McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme; 2016. Accessed November 25, 2019.
  120. Chihara K, Iwasaki J, Minamitani N, et al. Effect of vasoactive intestinal polypeptide on growth hormone secretion in perfused acromegalic pituitary adenoma tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(4):773-779. doi:10.1210/jcem-54-4-773.
  121. Weick RF, Stobie KM. Role of VIP in the regulation of LH secretion in the female rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1995;19(2):251-259. doi:10.1016/0149-7634(94)00057-8.
  122. Ottesen B, Hansen B, Fahrenkrug J, Fuchs AR. Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates oxytocin and vasopressin release from the neurohypophysis. *Endocrinology*. 1984;115(4):1648-1650. doi:10.1210/endo-115-4-1648.

123. Saga T, Said SI. Vasoactive intestinal peptide relaxes isolated strips of human bronchus, pulmonary artery, and lung parenchyma. *Trans Assoc Am Physicians*. 1984;97:304-310.
124. Nio DA, Moylan RN, Roche JK. Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immunoregulatory elements. *J Immunol*. 1993;150(12):5281-5288.
125. Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M. Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann NY Acad Sci*. 2000;921:92-102. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06954.x.
126. Yuwiler A. Light and agonists alter pineal N-acetyltransferase induction by vasoactive intestinal polypeptide. *Science*. 1983;220(4601):1082-1083. doi:10.1126/science.6844931.
127. Tatemoto K. Neuropeptide Y: Complete Amino Acid Sequence of the Brain Peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(18):5484-5489. Accessed March 24, 2018.
128. Corder R, Gaillard RC, Böhlen P. Isolation and sequence of rat peptide YY and neuropeptide Y. *Regulatory Peptides*. 1988;21(3-4):253-261. doi:10.1016/0167-0115(88)90008-0.
129. Hoyle C. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Research*. 1999;848(1-2):1-25. Accessed March 24, 2018.
130. Blomqvist A, Lundell I, Larhammar D. Strong Evolutionary Conservation of Neuropeptide Y between Mammals, Chicken, Goldfish, and Horned Shark. *Ann NY Acad Sci*. 1990;611(1):378. doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb48956.x.
131. Kimmel JR, Hayden LJ, Pollock HG. Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J. Biol. Chem*. 1975;250(24):9369-9376. <http://www.jbc.org/content/250/24/9369.full.pdf>.
132. Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptid Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature New Biol*. 1982;296(5858):659-660. Accessed March 24, 2018.
133. Blomqvist AG, Herzog H. Y-receptor subtypes--how many more? *Trends Neurosci*. 1997;20(7):294-298.
134. Kalra SP, Crowley WR. Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sciences*. 1984;35(11):1173-1176.
135. Gruaz NM, Pierroz DD, Rohner-Jeanrenaud F, Sizonenko PC, Aubert ML. Evidence that neuropeptide Y could represent a neuroendocrine inhibitor of sexual maturation in unfavorable metabolic conditions in the rat. *Endocrinology*. 1993;133(4):1891-1894. Accessed June 9, 2019.
136. Sainsbury A, Herzog H. Inhibitory effects of central neuropeptide Y on the somatotrophic and gonadotrophic axes in male rats are independent of adrenal hormones. *Peptides*. 2001;22(3):467-471. Accessed June 9, 2019.
137. Stanley BG, Leibowitz SF. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: A powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(11):3940-3943. doi:10.1073/pnas.82.11.3940.

138. Albers HE, Ferris CF. Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci Lett.* 1984;50(1-3):163-168.
139. Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol.* 1991;260(2 Pt 2):R321-7.  
doi:10.1152/ajpregu.1991.260.2.R321.
140. Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, et al. Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand.* 1982;116(4):477-480.  
doi:10.1111/j.1748-1716.1982.tb07171.x.
141. Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience.* 1985;15(4):1159-1181.
142. Chan-Palay V, Allen YS, Lang W, Haesler U, Polak JM. Cytology and distribution in normal human cerebral cortex of neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y. *J Comp Neurol.* 1985;238(4):382-389.  
doi:10.1002/cne.902380403.
143. Wahlestedt C, Ekman R, Widerlöv E. Neuropeptide Y (NPY) and the central nervous system: Distribution effects and possible relationship to neurological and psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 1989;13(1):31-54.  
doi:10.1016/0278-5846(89)90003-1.
144. Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (Lond).* 1931;72(1):74-87.  
doi:10.1113/jphysiol.1931.sp002763.
145. Chang MM, Leeman SE. Isolation of a Sialogogic Peptide from Bovine Hypothalamic Tissue and Its Characterization as Substance P. *The Journal of Biological Chemistry.* 1970;245(18):4784-4790. Accessed May 3, 2018.
146. Steinhoff MS, Mentzer B von, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev.* 2014;94(1):265-301.  
doi:10.1152/physrev.00031.2013.
147. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biol.* 1971;232(29):86-87.
148. Conlon JM. The Tachykinin Peptide Family, with Particular Emphasis on Mammalian Tachykinins and Tachykinin Receptor Agonists. In: Holzer P, ed. *Tachykinins*. Vol. 164. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer; 2004:25-61. *Handbook of Experimental Pharmacology, 0171-2004*; 164.
149. Maggio JE. Tachykinins. *Annu Rev Neurosci.* 1988;11:13-28.  
doi:10.1146/annurev.ne.11.030188.000305.
150. Gerard NP, Garraway LA, Eddy RL, et al. Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry.* 1991;30(44):10640-10646.  
doi:10.1021/bi00108a006.

151. Boyd ND, MacDonald SG, Kage R, Luber-Narod J, Leeman SE. Substance P receptor. Biochemical characterization and interactions with G proteins. *Ann NY Acad Sci.* 1991;632:79-93. doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb33096.x.
152. Ljungdahl Å, Hökfelt T, Nilsson G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat—I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience.* 1978;3(10):861-943. doi:10.1016/0306-4522(78)90116-1.
153. Hökfelt T, Vincent S, Dalsgaard CJ, et al. Distribution of substance P in brain and periphery and its possible role as a co-transmitter. *Ciba Found Symp.* 1982;(91):84-106.
154. Jessell TM. Substance P in nociceptive sensory neurons. *Ciba Found Symp.* 1982;(91):225-248.
155. Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Trends Neurosci.* 1981;4:267-269. doi:10.1016/0166-2236(81)90084-9.
156. Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Research.* 1975;100(2):235-252. doi:10.1016/0006-8993(75)90481-3.
157. Oehme P, Hilse H, Morgenstern E, Göres E. Substance P: does it produce analgesia or hyperalgesia? *Science.* 1980;208(4441):305-307. doi:10.1126/science.6154313.
158. Walsh DA, McWilliams D. Tachykinins and the cardiovascular system. *Curr Drug Targets.* 2006;7(8):1031-1042. doi:10.2174/138945006778019291.
159. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(22):4249-4264. doi:10.1007/s00018-016-2293-z.
160. Lorton D, Bellinger DL, Felten SY, Felten DL. Substance P innervation of the rat thymus. *Peptides.* 1990;11(6):1269-1275. doi:10.1016/0196-9781(90)90162-X.
161. Weinstock JV. The role of substance P, hemokinin and their receptor in governing mucosal inflammation and granulomatous responses. *Front Biosci.* 2004;9:1936-1943. doi:10.2741/1375.
162. Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol.* 2017;199(5):1543-1552. doi:10.4049/jimmunol.1601751.
163. Holzer-Petsche U, Lembeck F, Seitz H. Contractile effects of substance P and neurokinin A on the rat stomach in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* 1987;90(1):273-279. doi:10.1111/j.1476-5381.1987.tb16849.x.
164. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacology & Therapeutics.* 1997;73(3):173-217. doi:10.1016/S0163-7258(96)00195-7.
165. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics.* 1997;73(3):219-263. doi:10.1016/S0163-7258(96)00196-9.

166. Oehme P, Hecht K, Faulhaber HD, Nieber K, Roske I, Rathsack R. Relationship of substance P to catecholamines, stress, and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;10 Suppl 12:S109-11.
167. Oehme P, Krivoy WA. Substance P: a peptide with unusual features. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1983;4:521-523. doi:10.1016/0165-6147(83)90521-7.
168. Livett BG, Kozousek V, Mizobe F, Dean DM. Substance P inhibits nicotinic activation of chromaffin cells. *Nature*. 1979;278(5701):256-257. doi:10.1038/278256a0.
169. Cheung NS, Karlsson P, Wang JX, Bienert M, Oehme P, Livett BG. Functional studies with substance P analogues: effects of N-terminal, C-terminal, and C-terminus-extended analogues of substance P on nicotine-induced secretion and desensitization in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*. 1994;62(6):2246-2253. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62062246.x.
170. Khalil Z, Marley PD, Livett BG. Effect of substance P on nicotine-induced desensitization of cultured bovine adrenal chromaffin cells: possible receptor subtypes. *Brain Research*. 1988;459(2):282-288. doi:10.1016/0006-8993(88)90644-0.
171. Nieber K, Roske I, Oehme P. Stress-induced changes of the noradrenergic transmitter release in adrenals and the influence of substance P. *Biomed Biochim Acta*. 1989;48(8):557-559.
172. Faulhaber HD, Oehme P, Baumann R, et al. Substance P in human essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;10 Suppl 12:S172-6.
173. Faulhaber HD, Rathsack R, Rostock G, et al. Evidence of decreased plasma substance P levels in human essential hypertension and influence of prazosin treatment. *Biomed Biochim Acta*. 1983;42(7-8):1019-1025.
174. Rathsack R, Oehme P, Roske I, Hilse H. Substance P-like immunoreactivity in plasma and adrenal medulla of rats with spontaneous hypertension and WKY rats under acute stress. *Biomed Biochim Acta*. 1983;42(7-8):955-958.
175. Bremer AA, Leeman SE. Substance P. In: *Encyclopedia of life sciences*. Vol. 30. Chichester, England: Wiley; 2005:336.
176. Kemper CM, O'connor DT, Westlund KN. Immunocytochemical localization of dopamine- $\beta$ -hydroxylase in neurons of the human brain stem. *Neuroscience*. 1987;23(3):981-989. doi:10.1016/0306-4522(87)90173-4.
177. Goldstein M, Fuxe K, Hökfelt T, Joh TH. Immunohistochemical studies on phenylethanolamine-N-methyltransferase, dopa-decarboxylase and dopamine-beta-hydroxylase. *Experientia*. 1971;27(8):951-952. doi:10.1007/bf02135767.
178. Moons L, D'Hondt E, Pijcke K, Vandesande F. Noradrenergic system in the chicken brain: immunocytochemical study with antibodies to noradrenaline and dopamine-beta-hydroxylase. *J Comp Neurol*. 1995;360(2):331-348. doi:10.1002/cne.903600210.
179. Hartman BK. Immunofluorescence of dopamine-beta-hydroxylase. Application of improved methodology to the localization of the peripheral and

- central noradrenergic nervous system. *J Histochem Cytochem.* 1973;21(4):312-332. doi:10.1177/21.4.312.
180. Schemann M, Schaaf C, Mäder M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J Comp Neurol.* 1995;353(2):161-178. doi:10.1002/cne.903530202.
181. Hartman BK, Zide D, Udenfriend S. The use of dopamine -hydroxylase as a marker for the central noradrenergic nervous system in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(9):2722-2726. doi:10.1073/pnas.69.9.2722.
182. Fibiger HC. The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Research Reviews.* 1982;4(3):327-388. doi:10.1016/0165-0173(82)90011-X.
183. Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B. Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: A novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol.* 1997;378(4):454-467. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970224)378:4<454:AID-CNE2>3.0.CO;2-1.
184. Koelle GB, Friedenwald JA. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949;70(4):617-622. doi:10.3181/00379727-70-17013.
185. Koelle GB. The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 1954;100(1):211-235. doi:10.1002/cne.901000108.
186. Lehmann J, Fibiger HC. Acetylcholinesterase and the cholinergic neuron. *Life Sciences.* 1979;25(23):1939-1947. doi:10.1016/0024-3205(79)90596-4.
187. Eckenstein F, Sofroniew MV. Identification of central cholinergic neurons containing both choline acetyltransferase and acetylcholinesterase and of central neurons containing only acetylcholinesterase. *J. Neurosci.* 1983;3(11):2286-2291. doi:10.1523/JNEUROSCI.03-11-02286.1983.
188. Cuello AC, Sofroniew MV. The anatomy of the CNS cholinergic neurons. *Trends Neurosci.* 1984;7(3):74-78. doi:10.1016/S0166-2236(84)80161-7.
189. Levey AI, Armstrong DM, Atweh SF, Terry RD, Wainer BH. Monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: production, specificity, and immunohistochemistry. *J. Neurosci.* 1983;3(1):1-9. doi:10.1523/JNEUROSCI.03-01-00001.1983.
190. McGeer PL, McGeer EG, Peng JH. Choline acetyltransferase: Purification and immunohistochemical localization. *Life Sciences.* 1984;34(24):2319-2338. doi:10.1016/0024-3205(84)90419-3.
191. Rossier J. Serum monospecificity: A prerequisite for reliable immunohistochemical localization of neuronal markers including choline acetyltransferase. *Neuroscience.* 1981;6(6):989-991. doi:10.1016/0306-4522(81)90064-6.
192. Wenthold RJ, Mahler HR. Purification of rat brain choline acetyltransferase and an estimation of its half-life. *J Neurochem.* 1975;24(5):963-967. doi:10.1111/j.1471-4159.1975.tb03663.x.

193. Rossier J. Purification of rat brain choline acetyltransferase. *J Neurochem.* 1976;26(3):543-548. doi:10.1111/j.1471-4159.1976.tb01509.x.
194. Ichikawa T, Ishida I, Deguchi T. Monoclonal antibodies to choline acetyltransferase of rat brain. *FEBS Letters.* 1983;155(2):306-310. doi:10.1016/0014-5793(82)80626-1.
195. Ostermann-Latif C, Mäder M, Unger JW, et al. Characterization of mono- and polyclonal antibodies against highly purified choline acetyltransferase: a monoclonal antibody shows reactivity in human brain. *J Neurochem.* 1992;58(3):1060-1065. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb09362.x.
196. Benecke S, Ostermann-Latif C, Mäder M, et al. Antibodies raised against synthetic peptides react with choline acetyltransferase in various immunoassays and in immunohistochemistry. *J Neurochem.* 1993;61(3):804-811. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03590.x.
197. Schemann M, Sann H, Schaaf C, Mäder M. Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am J Physiol.* 1993;265(5 Pt 1):G1005-9. doi:10.1152/ajpgi.1993.265.5.G1005.
198. Ichikawa T, Ajiki K, Matsuura J, Misawa H. Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 1997;13(1):23-39. doi:10.1016/S0891-0618(97)00021-5.
199. Oh JD, Woolf NJ, Roghani A, Edwards RH, Butcher LL. Cholinergic neurons in the rat central nervous system demonstrated by in situ hybridization of choline acetyltransferase mRNA. *Neuroscience.* 1992;47(4):807-822. doi:10.1016/0306-4522(92)90031-V.
200. Kasashima S, Muroishi Y, Futakuchi H, Nakanishi I, Oda Y. In situ mRNA hybridization study of the distribution of choline acetyltransferase in the human brain. *Brain Research.* 1998;806(1):8-15. doi:10.1016/S0006-8993(98)00677-5.
201. Kimura H, McGeer PL, Peng F, McGeer EG. Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science.* 1980;208(4447):1057-1059. doi:10.1126/science.6990490.
202. Aquilonius SM, Eckernäs SÅ, Gillberg PG. Topographical localization of choline acetyltransferase within the human spinal cord and a comparison with some other species. *Brain Research.* 1981;211(2):329-340. doi:10.1016/0006-8993(81)90705-8.
203. Borges LF, Iversen SD. Topography of choline acetyltransferase Immunoreactive Neurons and fibers in the rat spinal cord. *Brain Research.* 1986;362(1):140-148. doi:10.1016/0006-8993(86)91407-1.
204. Sann H, McCarthy PW, Mäder M, Schemann M. Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in small diameter neurones of the rat dorsal root ganglion. *Neurosci Lett.* 1995;198(1):17-20. doi:10.1016/0304-3940(95)11951-R.
205. Sann H, McCarthy PW, Schemann M, Jurzak M, Poethke R, Pierau FK. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurones in a prevertebral



- sympathetic ganglion, the inferior mesenteric ganglion. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1995;54(3):195-205. doi:10.1016/0165-1838(95)00019-T.
206. Eckenstein F, Thoenen H. Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *The EMBO Journal*. 1982;1(3):363-368. doi:10.1002/j.1460-2075.1982.tb01175.x.
  207. Vincent SR, Satoh K, Armstrong DM, Fibiger HC. Substance P in the ascending cholinergic reticular system. *Nature*. 1983;306(5944):688-691. doi:10.1038/306688a0.
  208. Vincent SR, Satoh K, Fibiger HC. The localization of central cholinergic neurons. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 1986;10(3-5):637-656. doi:10.1016/0278-5846(86)90033-3.
  209. Oyagi S, Ito J, Honjo I. The origin of autonomic nerves of the middle ear as studied by the horseradish peroxidase tracer method. *Acta Oto-Laryngologica*. 1987;104(5-6):463-467. doi:10.3109/00016488709128275.
  210. Ylikoski J, Panula P. Neuropeptides in the middle ear mucosa. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1988;50(3):176-182. doi:10.1159/000275987.
  211. Uddman R, Kitajiri M, Sundler F. Autonomic innervation of the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1983;92(2 Pt 1):151-154. doi:10.1177/000348948309200211.
  212. Uddman R, Sundler F, Emson P. Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Zeitschrift fr Zellforschung*. 1984;237(2):321-327. doi:10.1007/BF00217151.
  213. Oliver C, Jamur MC, eds. *Immunocytochemical methods and protocols*. 3rd ed. New York, NY: Humana Press; op. 2010. Springer protocols; 588.
  214. Raffeld M, Jaffe ES. Avidin-Biotin Labeling of Cellular Antigens in Cryostat-Sectioned Tissue. In: Oliver C, Jamur MC, eds. *Immunocytochemical methods and protocols*. 3rd ed. New York, NY: Humana Press; op. 2010:271-279. Springer protocols; 588.
  215. Bratthauer GL. The Avidin-Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin-Biotin Binding Methods. In: Oliver C, Jamur MC, eds. *Immunocytochemical methods and protocols*. 3rd ed. New York, NY: Humana Press; op. 2010:257-270. Springer protocols; 588.
  216. Polak JM, van Noorden S. *Introduction to immunocytochemistry*. 3rd ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2003.
  217. Luttmann W. *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; 2009. Der Experimentator. Accessed May 2, 2018.
  218. Girolamo P de, Lucini C. Neuropeptide Localization in Nonmammalian Vertebrates. In: Merighi A, ed. *Neuropeptides: Methods and protocols*. New York: Humana Press; 2011:37-56. Springer protocols; 789.
  219. Sternberger LA, Sternberger NH. The unlabeled antibody method: comparison of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1986;34(5):599-605. Accessed November 21, 2019.

220. Wendelboe HG, Bisgaard K. Background. In: Key M, ed. *Dako Educational Guide - Immunohistochemical Staining Methods*. 4.th ed. Carpinteria, CA, USA; 2006:119-130. [http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/08002\\_25may06\\_ihc\\_guide\\_book.pdf](http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf). Accessed May 3, 2018.
221. Key M. *Dako Educational Guide - Immunohistochemical Staining Methods*. 4.th ed. Carpinteria, CA, USA; 2006. [http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/08002\\_25may06\\_ihc\\_guide\\_book.pdf](http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf). Accessed May 3, 2018.
222. Atwood KN. Troubleshooting. In: Key M, ed. *Dako Educational Guide - Immunohistochemical Staining Methods*. 4.th ed. Carpinteria, CA, USA; 2006:131-155. [http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/08002\\_25may06\\_ihc\\_guide\\_book.pdf](http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf). Accessed May 3, 2018.
223. Hsu SM, Soban E. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1982;30(10):1079-1082.
224. Goldie P, Hellström S, Idahl LA. Middle ear effusion induced by various inflammatory mediators and neuropeptides. An experimental study in the rat. *Acta Oto-Laryngologica*. 1989;108(3-4):246-252. doi:10.3109/00016488909125524.
225. Campos MM, Calixto JB. Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides*. 2000;34(5):314-322. doi:10.1054/npep.2000.0823.
226. Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, et al. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4760-4765. doi:10.1073/pnas.95.8.4760.
227. Goldie P, Hellstrom S. Autonomic nerves and middle ear fluid production: An Experimental Study in the Rat. *Acta Oto-Laryngologica*. 1988;106(1-2):10-18. doi:10.3109/00016488809107365.
228. Lundberg JM, Saria A, Brodin E, Rosell S, Folkers K. A substance P antagonist inhibits vagally induced increase in vascular permeability and bronchial smooth muscle contraction in the guinea pig. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(4):1120-1124. doi:10.1073/pnas.80.4.1120.
229. Newby DE, Sciberras DG, Ferro CJ, et al. Substance P-induced vasodilatation is mediated by the neurokinin type 1 receptor but does not contribute to basal vascular tone in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(3):336-344. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00017.x.
230. Dionne RA, Max MB, Gordon SM, et al. The substance P receptor antagonist CP-99,994 reduces acute postoperative pain. *Clin Pharmacol Ther*. 1998;64(5):562-568. doi:10.1016/S0009-9236(98)90140-0.
231. Cocquyt V, van Belle S, Reinhardt RR, et al. Comparison of L-758,298, a prodrug for the selective neurokinin-1 antagonist, L-754,030, with ondansetron for the prevention of cisplatin-induced emesis. *European Journal of Cancer*. 2001;37(7):835-842. doi:10.1016/S0959-8049(00)00416-0.

232. Ishii T, Kaga K. Autonomic nervous system of the cat middle ear mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1976;85(2 Suppl 25 Pt 2):51-57. doi:10.1177/00034894760850S211.
233. Goycoolea MV, Paparella MM, Carpenter A-M. Ganglia and Ganglion Cells in the Middle Ear: Their Presence in the Human and the Cat. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* 1982;108(5):276-278. doi:10.1001/archotol.1982.00790530012004.
234. Cakmak YO, Cotofana S, Jäger C, et al. Peri-arterial Autonomic Innervation of the Human Ear. *Sci Rep.* 2018;8(1):11469. doi:10.1038/s41598-018-29839-z.
235. Suzuki N, Hardebo JE, Owman C. Origins and pathways of choline acetyltransferase-positive parasympathetic nerve fibers to cerebral vessels in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10(3):399-408. doi:10.1038/jcbfm.1990.70.
236. Gosling JA, Dixon JS. Sensory nerves in the mammalian urinary tract. An evaluation using light and electron microscopy. *J Anatomy.* 1974;117(Pt 1):133-144.
237. Hamaji M, Kawai Y, Kawashima Y, Tohyama M. Distribution of peptidergic terminals of enteric origin in the rat celiac ganglion. *Neurosci Lett.* 1989;102(2-3):121-124. doi:10.1016/0304-3940(89)90065-7.
238. Cayé-Thomasen P, Schmidt PT, Hermansson A, Holst JJ, Thomsen J. Depletion of mucosal substance P in acute otitis media. *Acta Oto-Laryngologica.* 2004;124(7):794-797. doi:10.1080/00016480410017972.
239. Çalgüner E, Keskil S, Atasever A, Gözil R. Searching for fibers of facial nerve origin in the tympanic plexus: A tracer study. *turkish neurosurgery.* 2000;(10):108-111. [http://www.turkishneurosurgery.org.tr/pdf/pdf\\_JTN\\_398.pdf](http://www.turkishneurosurgery.org.tr/pdf/pdf_JTN_398.pdf). Accessed December 9, 2019.
240. Maynard RL, Downes N. Peripheral Nervous System. In: Maynard RL, Downes N, eds. *Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research.* London, U.K.: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2019:261-281.
241. Al-Hadithi BA, Mitchell J. The otic ganglion and its neural connections in the rat. *J Anatomy.* 1987;154:113-119.
242. Jingyuan Yim. *Zentralnervöse Verbindungen des Plexus tympanicus: eine Tracing Studie mit Dioctadecyl-tetramethylindocarbocyaninperchlorat.* [Dissertation]. Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Universität; 2019.
243. Tierney S, Russell JD, Walsh M, Folan-Curran J. Innervation of the rat tympanic membrane from the superior cervical and glossopharyngeal ganglia. *J Anatomy.* 1993;182(Pt 3):355-360.

## 7 Anhang

### Pufferlösungen

1. *Phosphate buffered saline* (PBS): 0,02M Phosphatpuffer; pH = 7,4 für 3 Liter
  - 27g NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
  - 1,63g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Roth, Karlsruhe, Germany)
  - 8,55g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
2. PBS-T (PBS mit Triton): 0,02M Phosphatpuffer; pH = 7,4, 0,9% Kochsalz, 0,3% Triton X-100 (AppliChem, Darmstadt, Germany)
  - In 2 Liter PBS werden 6ml Triton gelöst
3. Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) - Puffer: 0,05M Tris-Lösung (AppliChem, Darmstadt, Germany)
  - mittels 25% HCl auf pH = 7,4 titriert

### Aminosäuren und ihre Abkürzungen

Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Cystein	Cys
Glutamin	Gln
Glutaminsäure	Glu
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile

Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr
Valin	Val

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Meike Pfeiffer
geboren am	12. Januar 1993
Geburtsort	Karlsruhe
Nationalität	deutsch

### Schule und Studium

09/2003 – 06/2012:	Eichendorff-Gymnasium Ettlingen, Abschlussnote: 1,6
04/2013 – 07/2013:	Philipps-Universität Marburg, Studium der Zahnmedizin
10/2013 – 11/2019:	Goethe-Universität Frankfurt am Main, Studium der Humanmedizin

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 2

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 2

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 1

11/2018 – 03/2019:	ViDia Kliniken Karlsruhe, PJ-Tertial Chirurgie
03/2019 – 06/2019:	Krankenanstalt Rudolfstiftung Wien, PJ-Tertial Innere Medizin
07/2019 – 10/2019:	ViDia Kliniken Karlsruhe, PJ-Tertial Gynäkologie

### Zusätzliches

10/2014 – 12/2015:	Dr. Senckenbergische Anatomie Frankfurt, Studentische Hilfskraft im Kurs Anatomie 1
10/2016 – 10/2018:	Goethe-Universität Frankfurt am Main, Organisation und Tutor des Kurses Anatomie am Lebenden 1-3

## 9 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit und während des Studiums unterstützt haben.

Herr Prof. Nürnberger, meinen herzlichen Dank, dass Sie mich nicht nur bei dieser Arbeit bestens betreut, sondern mich vom ersten Tag meines Studiums an als Anatomieprofessor im Präp-Kurs bis zur Promotion die letzten sieben Jahre begleitet haben. Besonders Ihre ansteckende Begeisterung für die Anatomie, Physiologie, alle weiteren Naturwissenschaften und die Forschung hat mich mitgerissen und für den nötigen Spaß beim Lernen und beim Anfertigen dieser Arbeit gesorgt. Ihr außergewöhnliches Engagement in der studentischen Lehre wird der Universität in Ihrem wohlverdienten Ruhestand fehlen und in dieser Art nicht ersetzbar sein!

Ich danke Dr. Qian Zhang, der mir vom Erlernen der Techniken im Labor bis zur Auswertung am Computer stets unterstützend und geduldig zur Seite stand. Vielen Dank für meinen eigenen kleinen Arbeitsplatz, das Lösen meiner Computerprobleme und das Teilen des Arbeitszimmers.

Ich danke den Mitarbeitern im Institut für die hilfreichen Tipps, die gemeinsame Nutzung des Labors und die vielen aufmunternden Worte.

Mein größter Dank geht an meine Eltern, die mich auf meinem Weg so liebevoll und unterstützend begleiten.

Philipp, dank deiner Vorliebe für gutes Design und deinem unermüdlichen Perfektionismus sieht diese Arbeit richtig gut aus. Vielen Dank natürlich auch für jegliche Unterstützung als bester großer Bruder.

Danke Gordon, Kim, Antonia, Paulin und Felix, dass ihr mir wirklich immer mit einem schlaun Rat in jeder Lebenslage zur Seite steht und für die nötige Ablenkung sorgt.

Jan-Hendrik, danke, dass du immer noch ein bisschen mehr an mich glaubst als ich es selbst tue. Und für alles andere!

## 10 Schriftliche Erklärung

### Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Chemoarchitektur des Plexus tympanicus: Immunocytochemische Studien zum Nachweis von Transmittern und Peptiden bei Wistar-Ratten

in dem Institut für Anatomie II unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Frank Nürnberger mit Unterstützung durch Dr. Qian Zhang ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)