

3. Material und Methoden

3.1 Material

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

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

Des Weiteren erfolgten licht-, elektronenmikroskopische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an Proben der unteren Nasenmuschel von folgenden Patientengruppen: 11 Patienten mit cystischer Fibrose, davon 4 weibliche und 7 männliche Patienten (Altersverteilung: 3. bis 17. Lebensjahr, Altersdurchschnitt 8,3 Jahre), 25 Patienten mit perennialer allergischer

Rhinitis (14 Männer, 11 Frauen, Alter: 16 bis 70 Jahre, Altersdurchschnitt 37,6 Jahre) und 7 Patienten mit vasomotorischer Rhinopathie (3 Männer, 4 Frauen, Alter: 17 bis 39, Altersdurchschnitt: 27,4 Jahre).

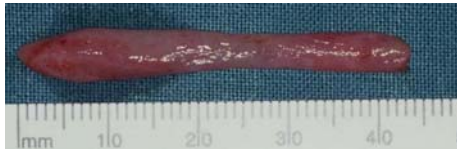


Abb.1a:
Operationspräparat einer unteren Nasenmuschel nach der Entnahme.



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

3.2 Methoden

3.2.1 Lichtmikroskopie

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

3.2.1.1 Fixierung und Konservierung

3.2.1.1.1 Paraffineinbettung

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

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

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

Die Paraffineinbettung erwies sich als weniger schonendes Verfahren, da bei Erwärmung der Präparate bis auf ca. 60 C⁰ und der Trocknungsprozedur Proteinstrukturen bzw. Antigen determinanten durch inter- und intramolekulare Vernetzungen verändert werden können. Allerdings konnte besonders bei der Paraffineinbettung eine gute Gewebekonservierung erreicht werden. Je nach verwendetem Primärantikörper erwies sich die Paraffinmethode oder die Gefriertechnik für die Immunhistochemie als geeignet.

3.2.1.1.2 Gefriertechnik

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

3.2.1.2 Qualitätskontrolle der Präparate

Zum Ausschluss pathologisch veränderter Präparate, d.h. durch massive Infiltration mit Entzündungszellen veränderter Schleimhäute, erfolgte eine histologische Begutachtung der zu untersuchenden Nasenmuscheln. Dazu wurden

die Gewebeproben mit Haematoxylin-Eosin (HE), Mayers saurem Hämalaun oder Toluidinblau O gefärbt, geeignete Gewebeschnitte selektiert und unbrauchbare Proben von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Zusätzlich erfolgten Azan- und van Gieson- Färbungen der Präparate. Die Voruntersuchung mit Hilfe routinemäßig angewendeter Färbemethoden sollte auch der Darstellung des histologischen Grundaufbaues der unteren Nasenmuschel dienen. Durch den Kontakt der Nasenschleimhaut mit verschiedenen Umwelttoxinen, Gasen, Stäuben, Aerosolen, Allergenen und Medikamenten (z.B. α -Sympathomimetika) sowie abgelaufene Entzündungen kann keine reizfreie bzw. normale Nasenschleimhaut vorgefunden werden (Jahnke, 1972). Morphologisch spiegelt sich dieser Sachverhalt u. a. in der Akkumulation von Lymphozyten im subepithelialen Bindegewebe wieder.

3.2.1.3 Histochemische Verfahren

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

3.2.1.3.1 Azetylcholinesterase (AChE)- Nachweis

Zum Nachweis der den postganglionären parasymphatischen Transmitter Azetylcholin hydrolysierenden Azetylcholinesterase wurde die Versuchsanordnung von Karnovsky und Roots (Karnovsky, 1964) in modifizierter Form angewendet. Gefrierschnitte kamen nach einer Auftauphase in Natriumazetat für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Inkubation in ein Medium (pH 5,5) bestehend aus 5mg Azetylthiocholin, 6,5ml Natriumazetat (0,1 molare Lösung, pH 6,0), 0,5ml Natriumzitratlösung (0,1 molar), 1,0 ml Kupfersulfat (0,03 molar), 1,0ml Kaliumhexazyanoferat (0,005 molar) und 1,0 ml H₂O. Es folgten Waschkvorgänge mit 0,1 molarem Natriumazetat (5x1 Minute), 1%igem Ammoniumsulfid (1 Minute), 0,1 molarem Natriumnitrat (5x1 Minute), 0,1%igem Silbernitrat (1 Minute) und 0,1 molarem Natriumnitrat (5x1 Minute). Das positive, braungefärbte Reaktionsprodukt entsteht durch einen Niederschlag von Kupferferrizyanid und markiert die Lokalisation der Azetylcholinesterase im Gewebe. Zusätzlich

erfolgten Reaktionskontrollen durch selektive Blockierung der Cholinesterasen mit Physostigmin (0,01 mM) zum Nachweis falsch-positiver Färbungen durch unspezifische Esterasen.

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

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

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

3.2.1.3.3 NADPH-d/ AChE-Doppelfärbung

Für den Nachweis der cholinerg-nitrogen Koinnervation wurde nach den Schritten der oben beschriebenen Technik zur Darstellung der NADPH-Diaphorase die histochemische Markierung der Azetylcholinesterase nach Karnovsky und Roots angeschlossen. Nach mehreren Spülungen der Präparate in PBS (3x10 Minuten) folgte die Inkubation in einer Lösung aus 0,5mg/ml Azetylthiocholinjodid, 29,4mg/ml Natrium-Citrat-2-Hydrat, 4,8mg/ml Kupfersulfat (wasserfrei), 1,65mg/ml Kaliumferrizyanit und 0,342mg/ml Iso-OMPA (Tetraisopropylpyrophosphoramid) in 0,1 molarem Natriumhydrogen-Maleatpuffer (pH 6,0) für 40 Minuten. Durch Einbringen der Präparate in PBS

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

3.2.1.4 Immunhistochemie

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

3.2.1.4.1 Primärantikörper

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

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

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

Im Rahmen der Vorbereitung für die immunhistochemischen Versuche wurden auch Positivkontrollen an Geweben durchgeführt, die das Antigen ebenfalls enthalten. Dazu kamen Präparate des menschlichen Dünndarms mit den Antikörpern zur Inkubation. Es konnten positive Immunreaktionen im Plexus submucosus Meissner und im Plexus myentericus Auerbach festgestellt werden. Außerdem wurden Kontrollen an Schnitten vom Rückenmark der Ratte als positiv getestet.

In der nachfolgenden Tabelle sind die einzelnen Antikörper, Hersteller mit Ortsangabe, die optimalen Verdünnungen, Inkubationszeiten (in Stunden), Inkubationstemperaturen (RT-Raumtemperatur von ca. +20 C⁰; KT-Kühlschranktemperatur von ca. +4 C⁰) und die jeweils verwendete Detektionsmethode aufgeführt.

Tabelle 1 mit den verwendeten Antikörpern

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

ANTI-KÖRPER	HER- STELLER	VER- DÜNNUNG	INKU- BATIONS- ZEITEN (h)	INKU- BATIONS- TEMPE- RATUR	DETEK- TIONS- METHODE
CGRP					
polyklonal	Peninsula; Belmont, USA	1 : 750	2	RT	ABC
polyklonal	Unger; München	1 : 750	2	RT	ABC
polyklonal	Milab; Schweden	1 : 1200	48	KT	ABC
polyklonal	Serotec; Oxford, UK	1 : 500	2	RT	ABC
polyklonal	Biotrend, Köln	1 : 1000	4	RT	ABC
VIP-Rez					
monoklonal	Dianova; Hamburg	1:100	2,5	RT	APAAP
SP					
polyklonal	Affiniti; Exeter, UK	1 : 1000	1 (18)	RT (KT)	ABC
polyklonal	Serotec; Oxford, UK	1 : 750	2	RT	ABC
NPY					
polyklonal	Peninsula; Belmont, USA	1 : 750	18	KT	ABC
polyklonal	Chemicon, Temecula, USA	1 : 1000	2	RT	ABC

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

3.2.1.4.2 Vorbereitung für die Immunhistochemie

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

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

Tabelle 2 mit den verwendeten Pufferlösungen

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

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

3.2.1.4.3 Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode

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

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

lichtmikroskopischer Kontrolle, bis eine entsprechend hohe Farbintensität erreicht war.

3.2.1.4.4 Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

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

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

3.2.1.4.5 Konservierung und Auswertung

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

3.2.1.5 Transmissionselektronenmikroskopie

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

3.2.1.5.1 Vorbereitung und Anfertigung der Präparate

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

3.2.1.6 Immunelektronenmikroskopie

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

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

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

3.2.1.6.1 Primärantikörper

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

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

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

Tabelle 3 mit den Antikörpern für die Immunelektronenmikroskopie

4. Ergebnisse

4.1 Zur Morphologie der Nasenschleimhaut

Bei den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich ein zum Teil mehrreihiges, auch teils flaches hochprismatisches Flimmerepithel mit zilientragenden Zylinderzellen, Becherzellen und Basalzellen auf einer unterschiedlich stark ausgeprägten Basalmembran (Abb.2a,2b,3a,4). Nach einer an