

Urologische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

TISSUE ENGINEERING EREKTILER NERVEN
- UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION UND EXPRESSION DER NOS-
ISOMERASEN-

Max V. Apprich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend
2. Priv.-Doz. Dr. F. P. H. H. May

Die Dissertation wurde am 18.10.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2008 angenommen.

	Seite
1. Einleitung.....	1
2. Schrifttum.....	4
2.1 Anatomie und Neurophysiologie Erektionsapparat.....	4
2.1.1 Anatomie.....	4
2.1.2 Peripherer Erektionsmechanismus.....	5
2.2 Radikale Prostatektomie.....	7
2.2.1 Radikale Prostatovesikulektomie.....	8
2.2.2 Nervenschonende Prostatektomie nach Walsh.....	8
2.3 Periphere Nerven.....	10
2.3.1 Anatomie.....	10
2.3.1.1 Das Neuron.....	10
2.3.1.2 Anatomie des peripheren Nerven.....	12
2.3.2 Regeneration der peripheren Nerven.....	14
2.4 Stickstoffmonoxid (NO).....	24
2.4.1 Stickstoffmonoxid als Schlüsselmolekül der Erektion.....	24
2.4.2 Funktionszyklus Stickstoffmonoxid.....	25
2.4.3 Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS).....	26
2.4.4 Rolle der NOS beim Erektionsprozess und beim Erhalt der Erektionsfähigkeit.....	29
2.4.5 Apoptoseregulation durch NOS in neuronalen Zellen und im Corpus cavernosum.....	32
2.4.6 Bedeutung der NOS-Isomerasen bei der Regeneration.....	33
2.5 Nervenrekonstruktion.....	34
2.5.1 Autologe Nerventransplantation.....	35
2.5.2 Artefizielle Nervenleitschienen.....	37
2.5.3 Bioartefizielle Nervenleitschienen.....	39
2.6 RT-PCR.....	40
2.6.1 Normalisierung PGP 9.5, GAPDH.....	42
3. Experimentelle Untersuchungen.....	45
3.1 Zielsetzung.....	45
3.2 Material und Methode.....	46
3.2.1 Material.....	46
3.2.1.1 Versuchstiere.....	46
3.2.1.2 Verwendetes Material.....	47
3.2.2 Methode.....	49
3.2.2.1 Versuchsplan.....	49

1. Einleitung

Die Inzidenz der Neuerkrankungen von Prostatakarzinomen liegt derzeit in Deutschland bei etwa 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen im Jahr. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei über 40% aller Männer über 60 Jahren Adenokarzinome der Prostata zu finden sind (Hautmann RE, 2001). Durch zunehmendes Screening werden immer mehr jüngere Patienten mit Prostatakarzinom im kurativen Stadium entdeckt. Patienten mit lokalisiertem Prostataneoplasien können heute mit guten Ergebnissen kurativ behandelt werden.

Jedoch spielen die Folgen erektiler Nervenläsionen eine immer bedeutendere Rolle. Wurde in der Vergangenheit die kurative Behandlung des Prostatakarzinoms stets verbessert und immer längere Überlebenszeiten erreicht, wird heute durch die guten kurativen Ergebnisse immer mehr Wert auf die postoperative Lebensqualität gelegt.

Der Goldstandard bei lokalisiertem Prostatakarzinom stellt die radikale retropubische Prostatovesikulektomie dar. Durch die anatomische Nähe der erektilen Nerven zur Prostata führt diese Operation jedoch häufig zu einer erektilen Dysfunktion (ED). Die Nervi erigentes sind parasymphatische, periphere Nervenfasern. Sie innervieren die glatte Muskulatur der Schwellkörper und sind für das Auslösen der Erektion zuständig.

Kommt es zu einer Verletzung dieser Strukturen, kann die Nervenläsion zur dauerhaften Impotenz führen. In den letzten Jahren wurde immer mehr Wert darauf gelegt möglichst nervenschonend zu operieren. Grundlegende Studien von Walsh und Donker erbrachten den exakten anatomischen Verlauf der Nervi erigentes und ermöglichen nervenschonende Operationsverfahren. Diese nervenschonende Operationstechnik ermöglicht es, die erektile Funktion bei einem großen Teil der Patienten zu erhalten. Da Prostatakarzinome jedoch häufig im Bereich der Perineuralscheiden das umgebende Gewebe penetrieren, können nervenschonende Operationsverfahren nur eingeschränkt angewandt werden. Aus onkologischen Gründen muss oft auf den Erhalt der erektilen Nerven verzichtet werden. Bei bilateraler Exzidierung der neurovaskulären Bündel ist in fast 100% der Fälle mit einer postoperativen Impotenz zu rechnen. Diese Komplikation stellt für die betroffenen Männer eine schwerwiegende Einschränkung der Lebensqualität dar (Siegel T, 2001).

Die ED wird als konstantes Unvermögen einer Erektion für befriedigenden Geschlechtsverkehr definiert. Sie wird heute bei vaskulären Erkrankungen, welche die Hauptursache einer ED darstellen, meist medikamentös behandelt. Oral applizierte Medikamente, z.B. der Phosphodiesterasehemmer Viagra (Sildenafil) kommen verstärkt zum

Einsatz. Erfolge können jedoch nur erzielt werden, solange neurovaskuläre Bündel zumindest partiell erhalten bleiben.

Für Patienten, bei denen die nervenschonende Operationstechnik nicht durchgeführt werden kann, kommt die Rekonstruktion erektiler Nerven als neuartige Therapieform in Betracht.

In Vorarbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass Silikonleitschienen mit Schwannschen Zellen (SC) bei der Rekonstruktion erektiler Nerven eine deutlich höhere Erfolgsrate erzielen, als autologe Nerventransplantate oder leere Leitschienen. GDNF-überexprimierende SC beschleunigten in Voruntersuchungen die Nervenregeneration. Um die funktionellen Ergebnisse der Vorarbeiten zu vertiefen und in die Klinik zu übertragen, sollen in dieser Arbeit die Konzentrationsänderungen der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) im Corpus cavernosum, welche das für die Erektion essentielle Biomolekül NO synthetisiert, untersucht werden. Dabei sollen verschiedene Nervenrekonstruktionsarten am Modell der Ratte in Hinsicht auf Funktionalität, intakavernösen Druck, Histologie und der NOS-Expression verglichen werden

In den letzten Jahren wird die herausragende Rolle des Mediators Stickstoffmonoxid (NO) bei der Erektion immer deutlicher. In zahlreichen Arbeiten wurde dessen Rolle bei Vermittlung der glattmuskulären Relaxation im Corpus cavernosum ermittelt. Weiterhin wird aber auch immer deutlicher, dass NO entscheidenden Einfluss auch auf die Nervenregeneration hat und ein wichtiger Regulator bei Steuerung der Apoptose neuronaler Zellen ist (Cristino L, 2000; Heneka L, 1998). Das Vorhandensein von NOS, welche NO synthetisieren und von denen drei verschiedene Typen im Corpus cavernosum gefunden wurden, stellen eine unbedingte Voraussetzung für das Erreichen einer Erektion dar (Gonzales-Cadavid NF, 2000). In allen Fällen der erektilen Dysfunktion wurden signifikant erniedrigte Konzentrationen von NOS gefunden.

Hier scheint vor allem das Vorhandensein der neuronalen NOS eine entscheidende Rolle zu spielen (Podlasek CA, 2001). In unserem Fall, der eine Nervenrekonstruktion der Nervi erigentes mit Hilfe von artefiziellen Leitschienen darstellt, soll die nNOS, iNOS, eNOS-Konzentration relativ zur gewählten Nervenrekonstruktion (SC, GDNF, Sham, Nervex, Trans) ausgewertet werden. Hierdurch sollen Rückschlüsse auf die Nervenregeneration gezogen werden.

Schlussendlich lässt sich sagen, dass sich immer mehr Männer auf Grund ihrer Impotenz Hilfe suchend an die Medizin wenden und deshalb auch immer mehr Grundlagenforschung in diese Richtung betrieben wird. Stützte man sich in der Vergangenheit mit oft unbefriedigenden Ergebnissen nur auf eine medikamentöse Therapie, versucht man jetzt die

Grundlagen zu verstehen und somit die Ursachen zu ermitteln und kurativ zu behandeln. Dafür bedarf es grundlegender Kenntnisse sowohl über neuronale als auch humorale Botenstoffe.

2.1 Anatomie und Neurophysiologie

2.1.1 Anatomie

Die Innervation des humanen erektilen Gewebes erfolgt über autonome (parasympathische und sympathische) und somatische (sensorische und motorische) Nervenfasern. Der Plexus pelvicus erhält sympathische Fasern aus dem zentralen Nervensystem über den Plexus hypogastricus und über die parasympathischen präsynaptischen Nn. splanchnici pelvini, die aus dem 2.-4. sakralen spinalen Segment entspringen (siehe Abb. 1). Die sympathischen Fasern des Plexus hypogastricus entspringen thorakolumbal in Höhe Th11-L2. Die somatische Innervation erfolgt über den N. pudendus.

Die Nn. cavernosi (syn.: Nervi erigentes, erektile Nerven, kavernöse Nerven) bilden im Bereich der proximal gelegenen Basis prostatae ein dorsolateral der Prostata gelegenes Nervengeflecht mit multiplen Nervenästen zur Prostata (Walsh, 1982). Dorsolateral des Prostataapex bilden die kavernösen Nerven die sog. „neurovaskulären Bündel“; ein Bündel bestehend aus kavernösen Nerven und Gefäßen verlaufend zwischen Prostatakapsel und Faszie. Lateral und dorsal der membranösen Harnröhre werden feine Äste zur Harnröhre abgegeben, während die neurovaskulären Bündel durch den Hiatus genitalis weiter nach kaudal ziehen und schließlich die Corpora cavernosa erreichen um dort die terminalen Arteriolen und das trabekelartige Geflecht der glatten Muskulatur (siehe Abb. 4) innervieren (Lue TF, 2001).

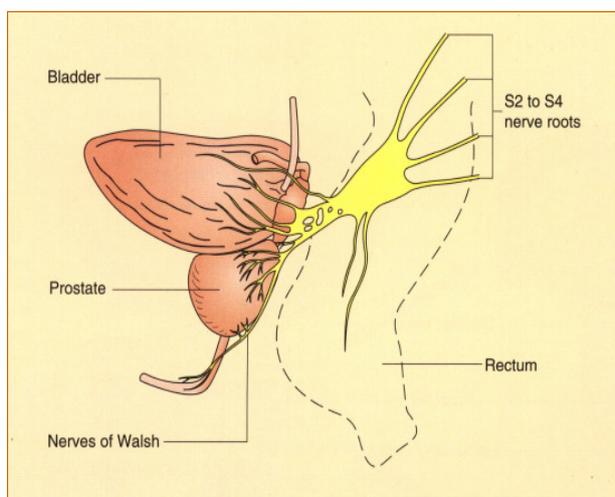


Abb.1 Verlauf der erektilen Nerven beim Menschen (nach Lepor et al., 1985).

Ratten stellen ein geeignetes Tiermodell für erektionsphysiologische Untersuchungen dar, da Neuroanatomie und Physiologie der Erektion dem Menschen sehr ähnlich sind. Auch bei Ratten sind multiple kavernöse Nervenfaserbündel unterschiedlicher Größe darstellbar (Zhang, 2001).

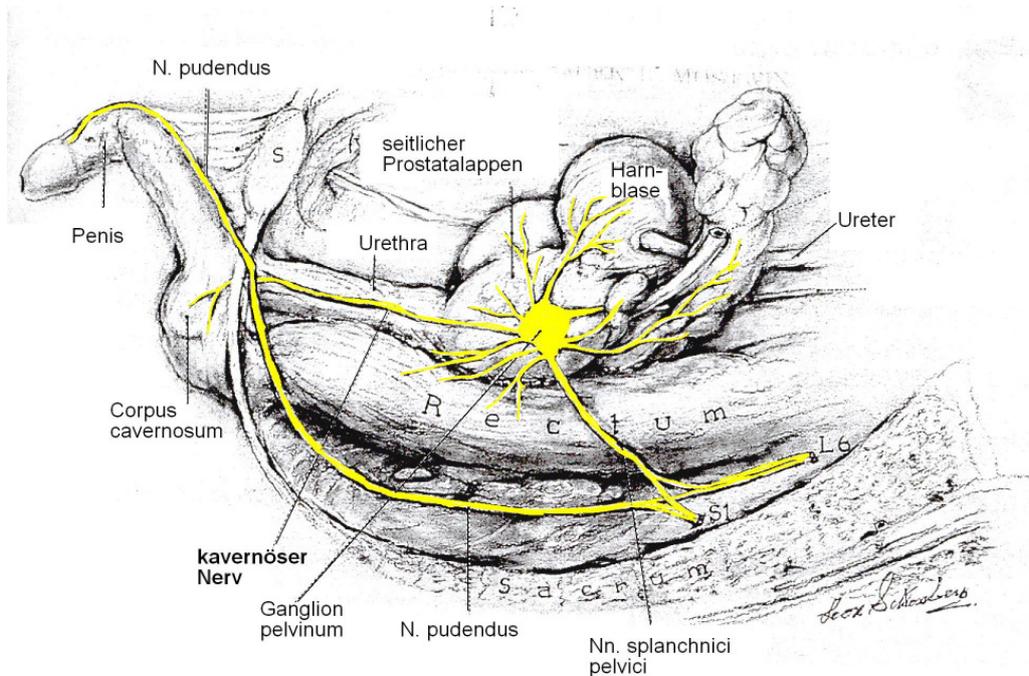


Abb. 2 Neuroanatomischer Situs bei der Ratte. Aus dem dorsolateral der Prostata gelegenen Beckenganglion (Ganglion pelvicum) setzt sich nach kaudal der N. cavernosus fort, der zwischen Rektum und Urethra durch das Diaphragma pelvis zu den Corpora cavernosa zieht (Quinlan et al. 1989).

2.1.2 Peripherer Erektionsmechanismus

Die Erektion des Penis stellt einen komplexen Prozess dar, der zentraler, peripherer, autonomer, somatischer, sensorischer und motorischer Neurone bedarf. Da sich diese Arbeit auf periphere Läsionen konzentriert, soll hier vor allem der periphere Mechanismus beleuchtet werden.

Erektionsfördernde Impulse erreichen die Corpora Cavernosa über die Nervi cavernosi (erektile Nerven, Nervi erigentes). Die Schwellkörper bilden ein schwammartiges Organ, welches zum großen Teil aus glatten Muskelfasern besteht. Durch eine autonome Innervation wird eine Relaxation der glatten kavernösen Myozyten induziert, wodurch es zu einer Dehnung (Tumeszenz) des Corpus cavernosum kommt.

Durch die Erweiterung der kavernen Räume mit Erniedrigung des peripheren Widerstandes kommt es zu einem erheblichen Bluteinstrom. Die Kompression der abführenden Venolen führt darauf zur Versteifung des Schwellkörpers (Rigidität).

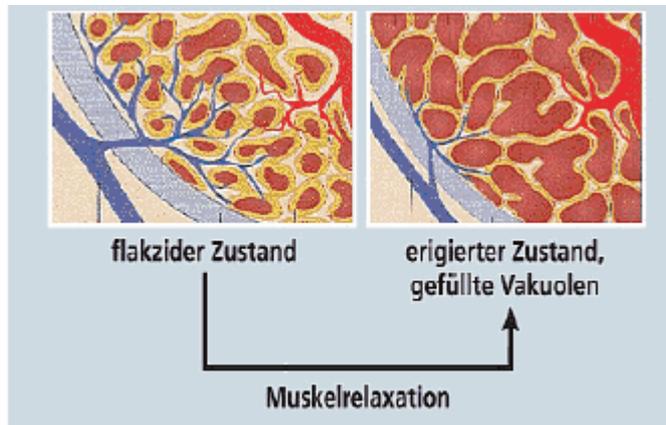


Abb. 3 Bluteinstrom ins Corpus cavernosum nach Relaxation der glatten Muskelzellen.

Die penile Erektion wird durch NO vermittelt. Bei sexueller Stimulation wird lokal NO im Corpus cavernosum synthetisiert und freigesetzt, was über einen komplexen Mechanismus zur Entspannung der trabekelartigen Gefäßmuskulatur und damit zur erhöhten Blutzufuhr der Corpora cavernosa führt (Ignarro LJ, 1990). Dieser Blutandrang verursacht durch Zunahme der Tumescenz und der Rigidität des Penis eine Erektion.

Vom Ort der Synthese, d.h. der Lokalisation der NOS, diffundiert NO zu den glatten Muskelfasern des Corpus cavernosum und stößt dort eine Enzymkaskade in Gang. Die Enzymkaskade läuft über mehrere Zwischenstufen ab. Den Anfang der Kaskade bildet NO, welches aus Nervenendigungen und Endothelzellen freigesetzt wird. Durch die erhöhte Konzentration von NO an den glatten Muskelfasern des Corpus cavernosum wird die Guanylatcylase stimuliert, die daraufhin aus GTP (Guanosintriphosphat) cGMP (cyclic-guanosine-monophosphate) synthetisiert und damit den cGMP-Spiegel erhöht. Die Erhöhung der cGMP-Konzentration bewirkt einen vermehrten Rücktransport von Kalzium in die Zelle und eine gesteigerte Aufnahme von Kalzium in Speicher. Die Abnahme der Kalziumkonzentration wird über cGMP durch Aktivierung einer Proteinkinase, der „Proteinkinase G“, erreicht.

Weiterhin steuert cGMP Ionenkanäle und Phosphodiesterasehemmer, welche zusätzlich eine Auswirkung auf den intrazellulären Kalziumspiegel haben (Ghalayini IF, 2004). Durch einen verminderten zytosolischen Kalziumspiegel kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Schwellkörpermuskulatur und der daraus resultierenden Erektion. Das cGMP-Signal wird durch eine Phosphodiesterase beendet, welche den second messenger zu

Guanosinmonophosphat (GMP) hydrolysiert. An dieser Stelle greifen synthetische Phosphodiesterasehemmer, z.B. Sildenafil, welche den cGMP-Spiegel durch Verlangsamung des Abbaus von cGMP anheben und damit die Erschlaffung der glatten Schwellkörpermuskulatur verlängern.

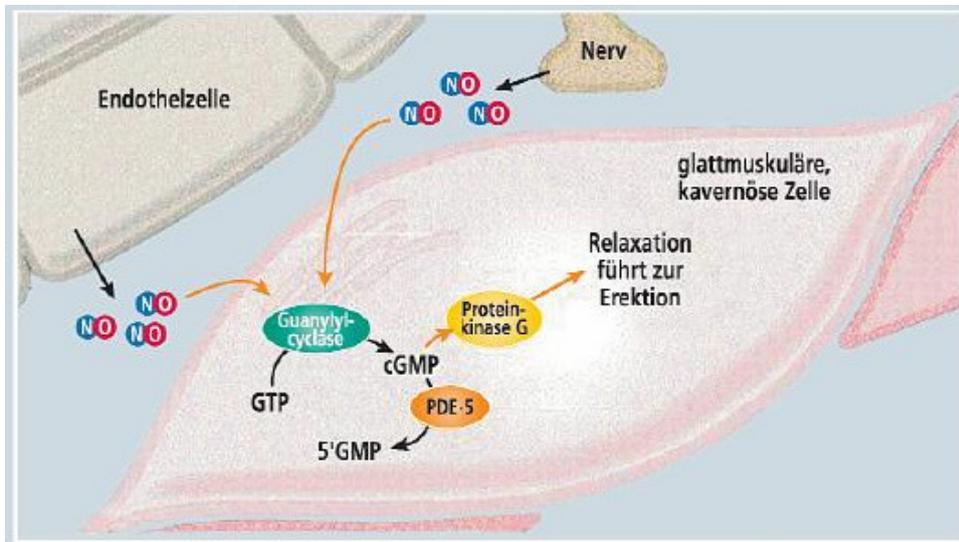


Abb. 4 Relaxation der glattmuskulären Zellen über den NO-cGMP Mechanismus.

2.2 Radikale Prostatektomie

Die radikale Prostatovesikulektomie wurde bereits vor hundert Jahren von H.H.Young durchgeführt und stellt noch heute auf Grund seiner hervorragenden onkologischen Ergebnisse den operativen Goldstandard bei der Behandlung des lokalisierten Prostatakarzinoms da.

Das Prostatakarzinom ist der mittlerweile häufigste bösartige Tumor innerhalb der männlichen Bevölkerung. Allein in Deutschland erkranken pro Jahr 40.000 Männer neu. Lange Zeit standen bei der Behandlung des malignen Prostata Tumors die Radikalität und das onkologische Ergebnis im Vordergrund (Madersbacher S, 2004).

Heute, bedingt durch gute onkologische Ergebnisse mit der Möglichkeit des Langzeitüberlebens, gewinnen Fragen nach der postoperative Lebensqualität immer mehr an Bedeutung. Die bei der Prostatovesikulektomie häufig auftretende Komplikation der neurogenen erektilen Dysfunktion verlangt nach alternativen, modifizierten Therapieansätzen. So stellt die nervenschonende Prostatektomie, welche dank revolutionärer anatomischer Studien (Walsh PC, 1984) möglich wurde, eine gute Alternative dar, welche oft mit einem Erhalt der erektilen Funktion verbunden ist. Diese Operationstechnik findet jedoch nur

begrenzt Anwendung. Da Prostatakarzinome dazu tendieren die Kapsel meist über die Perineuralspalten der Nerven zu penetrieren, kommt es häufig bei fortgeschrittener Tumorprogredienz zu Infiltrationen des neurovaskulären Bündels.

Andere Verfahren, wie die autologe Nerventransplantation, die erfolgreich bei motorischen peripheren Nerven angewendet werden, zeigen - durch mehrere Studien belegt - leider wenig Erfolg. Es besteht deshalb großes wissenschaftliches sowie klinisches Interesse an innovativen Therapiestrategien erektile Nerven zu rekonstruieren.

2.2.1 Radikale Prostatovesikulektomie ohne Nervenschonung

Durch die seit über 100 Jahren durchgeführte radikale Prostatovesikulektomie können lokalisierte Prostatakarzinome kurativ entfernt werden. Eine radikale Prostatektomie kann über einen suprapubischen extraperitonealen Zugang, perineal oder laparoskopisch durchgeführt werden. Der retropubische Zugang bietet im Gegensatz zum perinealen Zugang den Vorteil, dass gleichzeitig eine Lymphadenektomie erfolgen kann. Die radikale Prostatektomie schließt die vollständige Entfernung der Prostata, der anhängenden Samenblasen und eines Teiles der Samenleiter mit ein.

Bezüglich des Komplikationsspektrums der radikalen Prostatektomie stehen ein Verlust der erektilen Funktion sowie in einigen Fällen ein Kontinenzverlust (ca. 5%) im Vordergrund (Hautmann, 2001). Durch die radikale Operation (OP) mit Entfernung der Kapsel und der neurovaskulären Bündel entstehen bilateral Defekte der Nervi cavernosi, welche unweigerlich zum Verlust der erektilen Funktion bei nahezu allen Patienten führen (Siegel T, 2001).

2.2.2 Nervenschonende Prostatovesikulektomie nach Walsh (nerve-sparing radical prostatectomy)

Auf der Basis anatomischer Untersuchungen zum Verlauf der für die Potenz verantwortlichen autonomen Nerven, wurde erstmals durch Walsh et al eine die Nervi cavernosi schonende Prostatektomie durchgeführt (Walsh PC, 1982). Hierbei wird versucht, je nach Infiltration des Prostatakarzinoms, das neurovaskuläre Bündel zu schonen. Durch diese Art der Operation werden heute deutlich verbesserte funktionelle Operationsergebnisse erzielt. So kann bei über 70% der Patienten, die praeoperativ sexuell aktiv waren, eine zufriedenstellende Erektion wiedererlangt werden (Klotz L, 1999). Außer der vor der OP intakten Erektionsfähigkeit stellen das Alter (< 65 Jahre) und das Nichtvorhandensein gefäßschädigender Risikofaktoren die wichtigsten positiven Faktoren für eine postoperative erektile Funktion dar. Hierbei muss

man die bilaterale Schonung von der einseitigen unterscheiden. Bei unilateraler Nervenschonung ergab sich nach einem Jahr eine Erektionshäufigkeit von 42%, während bei bilateraler nervenschonender Prostatektomie eine Erektionshäufigkeit von über 59% festgestellt werden konnte (Catalana WJ, 1990).

Jedoch stößt auch dieses Verfahren an seine Grenzen, wenn die Penetration des Tumors bilateral zu weit fortgeschritten ist, d.h. wenn der Tumor die Prostatakapsel infiltriert bzw. der Tumor durch Palpation erkennbar ist. Auch sollte ein Nervenerhalt nur bei klinisch auf die Prostata beschränkten Tumoren bei gleichzeitig guter histologischer Differenzierung, bei T1-T2-Staging und Gleason sum<8 angestrebt werden (Aus G, 2003).

2.3. Periphere Nerven

Das Nervensystem wird anatomisch in das zentrale und das periphere Nervensystem unterteilt. Das zentrale Nervensystem umfasst Gehirn und Rückenmark, das periphere jenes Nervengewebe außerhalb davon. Aufgrund des Themas dieser Arbeit, welche sich mit der Regeneration peripherer Nerven beschäftigt, soll hier nur auf die Beschreibung peripherer Nerven eingegangen werden, welche sich von zentralen Nerven in Anatomie und Regenerationsfähigkeit unterscheiden.

2.3.1 Anatomie und Histologie des peripheren Nervens:

2.3.1.1 Anatomie des Neurons

Die strukturelle und funktionelle Einheit des Nervensystems ist das Neuron. Unter dem Begriff Neuron fasst man eine Nervenzelle mitsamt ihren Fortsätzen zusammen. Die Form der einzelnen Neuronen unterscheidet sich in den verschiedenen Teilen des Nervensystems. Gemeinsam sind ihnen lange zytoplasmatische Fortsätze die vom Zelleib ausgehen.

Das Perikaryon, der Zellkörper einer Nervenzelle, umgibt den Zellkern und enthält die wichtigsten Organellen des Neurons. Die von ihm ausgehenden Zellfortsätze dienen der Impulsleitung. Hierbei leiten die Dendriten (gr. Dendron = Baum), welche Zellfortsätze sind, die Impulse zum Perikaryon. Die Axone (Neuriten) hingegen leiten die Impulse vom Zellkörper in Richtung Peripherie. Dabei besitzt jedes Neuron nur ein Axon. Das Axon entspringt aus dem kegelförmigen Teil des Zellkörpers, dem Axonhügel. Das Axon ist ein zylindrischer Fortsatz unterschiedlicher Länge, es endet an anderen Neuronen bzw. mit einer variablen Zahl kleiner Äste mit Endknöpfen.

Die Axone werden vom Neurolemm (Schwann'sche Scheide), einer dünnen zellulären Hülle, umgeben. Das Neurolemm wird durch sich um das Axon wickelnde SC gebildet. Die SC unterstützen das Axon mechanisch und biochemisch. Im Allgemeinen sind Axone kleinen Durchmessers - z.B. Axone des autonomen Nervensystems oder kleine Schmerzfasern - direkt vom Zelleib der SC umhüllt. Diese Nervenfasern werden als marklos bezeichnet. Finden sich unter der Schwann'schen Scheide Lipoid-Ablagerungen aus Myelin so wird der Nerv als markhaltig bezeichnet. Mit fortschreitender Myelinisierung schiebt sich die SC mehrfach um das Axon, so dass das Axon spiralig von mehreren Lipoproteinmembranen umgeben ist (siehe Abb.5b). Die Markhaltigkeit eines Nervs spielt eine entscheidende Rolle für dessen

Nervenleitgeschwindigkeit. Die Nervenleitgeschwindigkeit, welche proportional zum Axondurchmesser ist, erfährt durch eine Erhöhung des Myelinisierungsgrades eine massive Steigerung. Nervenfaserssegmente bestimmter Länge werden jedoch jeweils nur von einer einzelnen SC bedeckt. An der Grenze zum nächsten Segment finden sich durch die fehlende Markscheide Einschnürungen, welche nach seinem Entdecker Ranviersche Schnürringe genannt werden. Der Abschnitt zwischen zwei Schnürringen wird als Internodium bezeichnet. Das Internodium spiegelt somit die Länge eines von einer SC isolierten Bereiches wieder. Den SC, die wie bereits oben erwähnt, Aufgaben des Schutzes und der Stützung des Axons übernehmen, kommen weiterhin wichtige Aufgaben in der Regeneration bei Nervenläsionen zu. Hierbei können von der SC zahlreiche Faktoren exprimiert werden, welche die Regeneration des geschädigten Nervens steuern.

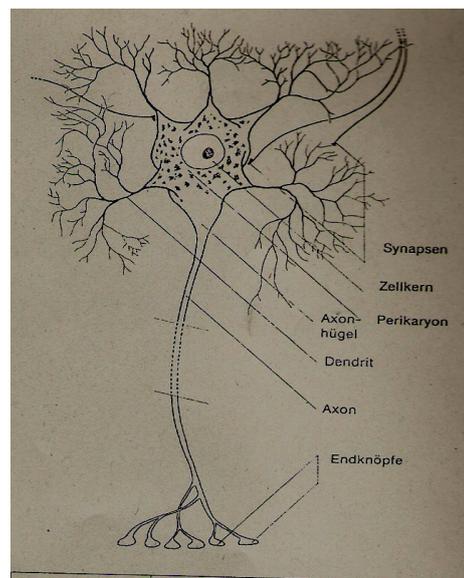
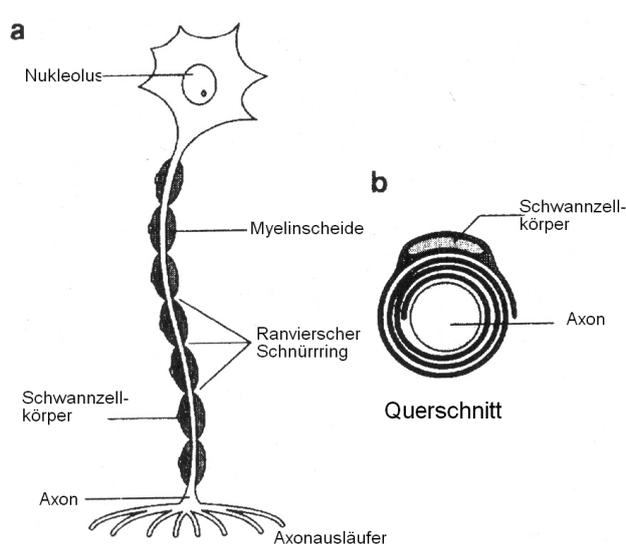


Abb. 5 a) Längsansicht Neuron mit Ranvierschen Schnürringen

Abb. 6 schem. Aufbau eines Neurons

b) Querschnitt Axon

Der Ausdruck „Nervenfaser“ bezeichnet sowohl zuführende als auch vom Perikaryon fortleitende Nervenfortsätze. Im peripheren Nervensystem sind die Perikarien der Neurone häufig in Ganglien lokalisiert.

2.3.1.2 Anatomie des peripheren Nerven

Periphere Nerven bestehen aus einem kabelartigen Strang von Nervenfaserfaszikeln unterschiedlicher Größe, die in ihrem Längsverlauf plexusartig miteinander in Verbindung stehen und von einer gemeinsamen, bindegewebigen Hülle, dem Epineurium, umgeben sind (siehe Abb.7).

Das Epineurium ist keine geschlossene Hülle, sondern ein lockeres, fettreiches durch Kollagenfasern verstärktes Bindegewebe, welches den Nerv mit dem umgebenden Gewebe verbindet und schützt. Es dient den Nervenfasern als Schutz und Verschiebeschicht (Lundborg G, 1987). Außer den Nervenfaszikeln enthält es unter anderem die den Nerv versorgenden Gefäße, die Vasa nervorum. Die einzelnen Nervenfaszikel werden vom Perineurium umhüllt, welches aus mehrschichtig, zirkulär geordnetem Gewebe besteht und die einzelnen Faszikel zu Bündeln zusammenfasst. Dem Perineurium kommen wichtige Aufgaben als Diffusionsbarriere zwischen Nerv und umliegendem Gewebe zu. Der Nervenfasern direkt liegt das Endoneurium an, welches aus Kollagenfasern, Fibroblasten und Kapillaren besteht. Das Endoneurium, bzw. dessen kollagene Fasern, bilden durch die enge Lokalisation den Nerven unterstützende Wände, die so genannten „endoneural tubes“ (Luther D, 1988).

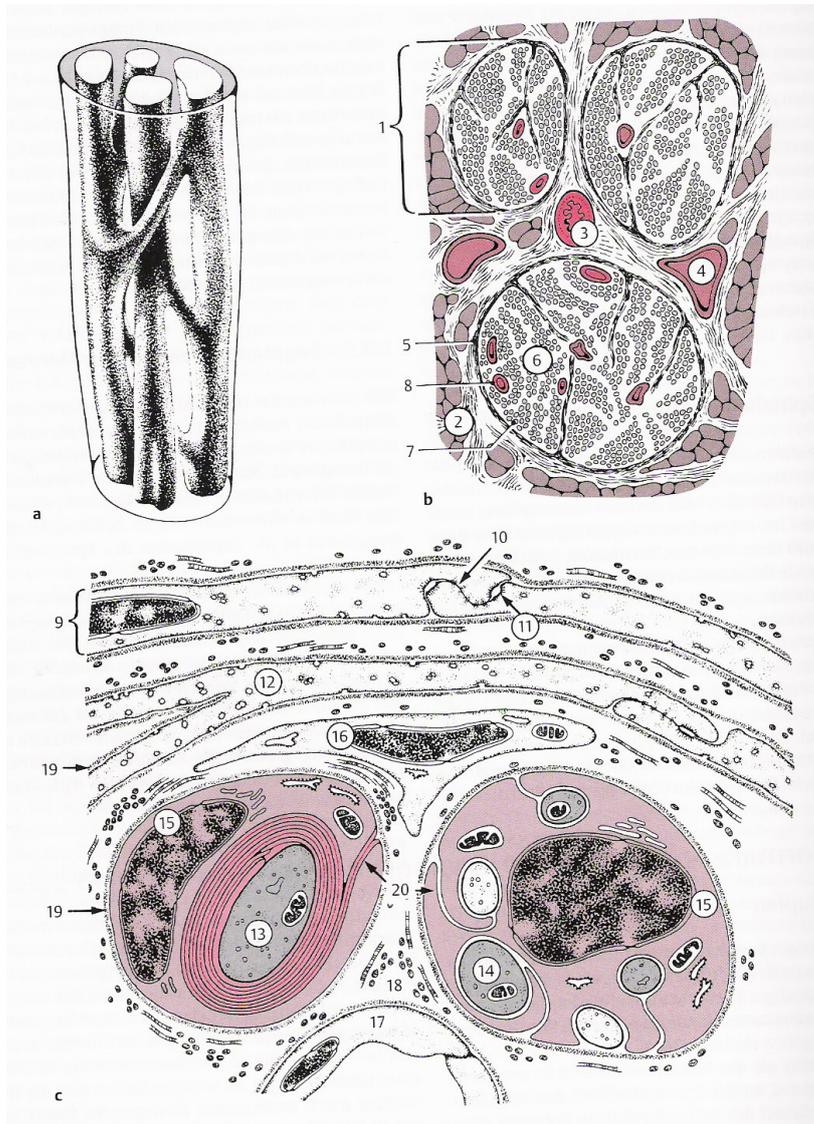


Abb. 7 Peripherer Nerv (schematische Darstellung).

a) Lupenvergrößerung: plexusartiger Aufbau der Nervenstränge

b) Lichtmikroskopische Vergrößerung: Nebst den Nervenfaszikeln (1), die in einem gemeinsamen fett- und bindegewebsreichen Epineurium (2) liegen, sind die Vasa nervorum (3 = Arterien; 4 = Venen) sichtbar. Vom Perineurium (5) ausgehende Septen unterteilen die Faszikel. Im Endoneurium (6) sind Markfasern (7) und Kapillaren (8) erkennbar.

c) Elektronenmikroskopische Vergrößerung: Die Abbildung zeigt einen nahe dem Perineurium gelegenen Faszikelausschnitt. Die abgeflachten Perineurialzellen (9) sind durch Zonae occludentes (10 = "tight junctions") und Desmosomen (11) dicht untereinander verbunden. Das Zytoplasma der Perineurialzellen enthält zahlreiche Pinozytosebläschen (12). Im Endoneurium sind bemerkte (13) und unbemerkte Axone (14), SC (15), ein Fibrozyt (16) und eine Kapillare (17 = Endothelzelle) erkennbar. Das endoneurale Interstitium enthält zahlreiche Kollagenfibrillen (18). Perineurial-, Endothel- und SC sind von einer Basalmembran (19) bedeckt (20 = Mesaxon). (Modifiziert nach Mumenthaler M).

2.3.2 Regeneration peripherer Nerven

Obwohl Nervenzellen im Laufe ihrer Differenzierung die Fähigkeit verlieren sich zu teilen, verfügen sie über Regenerationsmechanismen, welche es möglich machen, Defekte zu überbrücken und die Innervation wieder herzustellen. Die Fähigkeit zur Regeneration ist bei peripheren Nerven im Vergleich zu Nerven des zentralen Nervensystems deutlich besser ausgeprägt. Hierbei müssen jedoch gewisse Voraussetzungen (Fansa H, 2003) erfüllt werden. Erstens setzt die erfolgreiche Regeneration nach Nervenläsionen ein Überleben des Neurons voraus. Nur so können über die Nervenzelle die für die Regeneration essentiellen Stoffwechselvorgänge eingeleitet werden. Das Überleben der Nervenzelle ist wiederum abhängig von der Art der verletzten Nervenzelle, der Art und dem Ausmaß der Läsion, sowie der Entfernung der Axonverletzung vom Zellsoma.

Zweitens muss ein organisierter Regenerationsprozess stattfinden, welcher durch komplexe Interaktionen von Nervenzellen, SC und einer Vielzahl an Botenstoffen das richtige Endorgan reinnervieren muss. Das Endorgan selbst muss hierbei in der Lage sein noch reinnerviert zu werden und sich zu regenerieren. Zu einer suffizienten peripheren Nervenregeneration kommt es also nur durch ein optimales Zusammenspiel zwischen Neuron, SC, Botenstoffen und dem Endorgan.

Überleben des peripheren Neurons

Die wichtigste Voraussetzung für die erfolgreiche Regeneration eines Axons nach einer Läsion stellt das Überleben der Nervenzelle dar. Dies ist vor allem abhängig von

- a) der Art der Nervenzelle; hierbei sind zum Beispiel sensible Nervenzellen leichter zu schädigen als spinale Nervenzellen (Fu SY, 1997)
- b) dem Alter der Nervenzelle; im Tierexperiment sind Neurone des erwachsenen Tieres stabiler als Nervenzellen des in Entwicklung befindlichen Tieres (Goldberg JL, 2000)
- c) der Art der Verletzung und deren genaue anatomische Lokalisation; so führen Läsionen, welche weiter vom Zellkörper entfernt sind mit geringerer Wahrscheinlichkeit zum Zelltod (Ma QP, 2000).

Die exakten Mechanismen, welche die Zelldegeneration verursachen, sind noch immer weitgehend unbekannt. Neurotrophische Faktoren haben aber einen großen Einfluss auf das Überleben der Nervenzelle, und ihr Fehlen scheint verantwortlich für die Einleitung des Zelltodes (Berstein-Goral H, 1997). Neurotrophische Faktoren werden in zahlreichen Zellen produziert, wichtige Produzenten sind hierbei die SC; aber auch Makrophagen und

Fibroblasten sind an ihrer Bildung beteiligt. Eine schnelle Wiederherstellung der axonalen Kontinuität des Nervens begünstigt dessen Überleben und spätere Funktion (Fu SY, 1997).

Kommt es zum Überleben der Nervenzelle laufen verschiedene morphologische, physiologische und molekulare Veränderungen in der Zelle ab, die eine Transformation vom ruhenden zum aussprossenden Neuron bewirken. Es kommt in der Zelle zum Auflösen der Nissl-Körperchen, zu einer Exzentrierung des Zellkerns, zu einer Vergrößerung der Nukleoli und letztendlich zu einem Anschwellen der Zelle, welche als Chromatolyse bezeichnet wird (Schröder JM, 2001). Im Neuron wird parallel zu diesen intrazellulären Änderungen die Proteinsynthese umgestellt, und es kommt zu einer gesteigerten Produktion von Substanzen, welche das Auswachsen der Axone unterstützen.

Regenerationsprozess

Eine erfolgreiche Nervenregeneration bedarf zahlreicher Faktoren. So spielen sowohl mechanisch-topographische Faktoren, wie von SC gebildete Leitschienen (Büchner-Band), chemische (Zytokine) und diverse wachstumstumsfördernde Substanzen, als auch eine ausreichende Versorgung des regenerierenden Nervens mit Nährstoffen eine wichtige Rolle. Ohne deren Zusammenspiel kann keine erfolgreiche Wiederherstellung der Nervenfasern erfolgen.

Bei der Regeneration der peripheren Nerven muss weiterhin nach dem Ausmaß der Schädigung unterschieden werden. Während bei erhaltener Kontinuität der Axone ein paranodaler bzw. segmentaler Markscheidenzerfall im Bereich der Läsion erfolgt, kommt es bei einer Axondurchtrennung - der sog. Axonotmesis - zu einer Waller-Degeneration, welche mit einem vollständigen Abbau des distalen Axonteils einhergeht. Die Wiederherstellung der Kontinuität wird durch vom proximalen Abschnitt des Nervens ausgehenden Nervensprossen (sprouts) erreicht, welche den Defekt überbrücken und in den distalen Teil des Nervens vorwachsen.

Waller-Degeneration

Die Schädigung eines peripheren Nervens, bei welcher es zu einer Durchtrennung der Nervenfasern kommt, führt zu einer anterograden Degeneration des distalen Axonabschnitts. Dieses gesetzmäßig eintretende Prinzip wird zu Ehren seines Erstbeschreibers Waller-Degeneration genannt.

Der Ablauf der Degeneration verläuft in charakteristischen Phasen. Diese laufen jedoch zeitlich je nach morphologischen Unterschieden des betroffenen peripheren Nervens ab.

So kann bei dünnen Nervenfasern, neben einem wesentlich schnellerem distalwärts gerichtetem Fortschreiten, eine deutlich verminderte Latenzzeit bis zum Beginn der Regeneration gegenüber dicken Nervenfasern ermittelt werden.

Nach Durchtrennung eines Axons (Axonotmesis) kommt es nach einer Latenzphase von meist wenigen Tagen zur Auflösung der Axone, welche sich beim proximalen Teil auf das letzte Segment beschränkt, während der distale Axonabschnitt komplett aufgelöst wird. Weiterhin kommt es zu einem Abbau der Markscheiden durch SC und eingewanderte Makrophagen (Brück W, 1997). Ein kompliziertes Zusammenspiel aus Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmolekülen und der extrazellulären Matrix steuert die axonale Regeneration.

Parallel zum Axon- und Markscheidenzerfall kommt es zu einer massiven Proliferation von SC. Schon wenige Tage nach Axondurchtrennung können vermehrt bei SC Mitosen nachgewiesen werden. Dabei kann es zu einer Konzentrationserhöhung bis auf das Achtfache der Norm kommen (Segal R, 1992).

Die durch die Proliferation entstandenen SC verbleiben im weiteren Verlauf im Neurolemm der zerfallenen Nervenfasern und bilden dort längsorientierte Zellsäulen. Diese sogenannten Büngner-Bänder stellen Zellformationen dar, denen eine entscheidende Rolle bei der Regeneration von peripheren Nerven zukommt, indem sie neu einsprossenden Axonen als Leitschienen dienen (Büngner O, 1891; Dubey N, 1999).

- 1 Perikaryon
- 2 Axon, Axonsprossen
- 3 SC
- 4 Basalmembran der SC
- 5 SC-Mitose
- 6 Markscheide
- 7 Markscheidenabbauprodukte
- 8 Makrophagen
- 9 Büngner-Bänder
- 10 Muskelfaser
- 11 Bindegewebsnarbe
- 12 Amputationsneurom

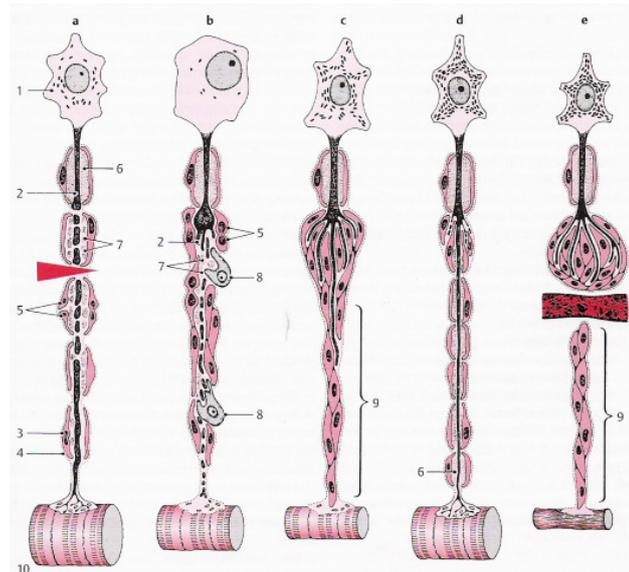


Abb. 8 Phasen der Degeneration und Regeneration einer Marksfaser im peripheren Nerv

- a) 1-4 Tage nach Durchtrennung: Der distale Stumpf zerfällt entsprechend dem Gesetz der Waller-Degeneration. Dieser Zerfall beginnt proximal, während die distalen Anteile noch erhalten sind. Diese Markscheidenzerfallsprodukte liegen in Form von "Markballen" in den SC, die sich bereits durch mitotische Teilung vermehren. Am proximalen Stumpf erstreckt sich die retrograde Degeneration auf ein Markscheidensegment. Am neuronalen Perikaryon setzt eine zentrale Chromatolyse ein.
- b) 10-21 Tage nach dem Durchtrennen: Die Waller-Degeneration erstreckt sich bis zum Endorgan (hier motorische Endplatte). Die Muskelfaser zeigt eine beginnende Dennervierungsatrophie. Durch Proliferation der SC entsteht das Büngner-Band, in dem sich noch einige Axon- und Myelinabbauprodukte befinden. Makrophagen beteiligen sich an der Verdauung der Abbauprodukte. Aus dem Wachstumskolben, der sich an der Demarkationsstelle des proximalen Stumpfes gebildet hat, sind bereits multiple Axonsprossen ausgewachsen. Ausgeprägte chromatolytische Reaktion im Perikaryon.
- c) Mehrere Monate nach Durchtrennung: Fortgeschrittene Regenerationsphase mit unterschiedlich schnell wachsenden Axonsprossen, die zum Teil wieder in die Büngner-Bänder vorgewachsen sind, ihr Zielgebiet jedoch nicht erreicht haben. Ausgeprägte Denervierungsatrophie der Muskelfaser. Rückbildung der chromatolytischen Reaktion im neuronalen Perikaryon.
- d) Reinnervation des Endorgans: Der am schnellsten wachsende Axonsproß hat das Endorgan, die motorische Endplatte, erreicht und die zugehörige Muskelfaser reinnerviert. Die kollateralen Axonsprossen, die kein Endorgan erreicht haben, bilden sich zurück. Der regenerierte Achsenzylinder ist von neu gebildeten, dünnen Markscheiden umgeben, die eine deutlich kürzere Segmentlänge aufweisen. Im Perikaryon ist die Nissl-Substanz wiederhergestellt. Die reinnervierte Muskelfaser hat wieder annähernd die normale Dicke angenommen.
- e) Neuombildung: Sofern die aussprossenden Axone ihr Zielgebiet nicht erreichen können, wie dies bei Narbenbildung zwischen proximalem und distalem Stumpf der Fall ist, kommt es am proximalen Stumpf durch aberrierende Nervenfaserverregeneration, Schwann-Zell und Fibroblastenwucherung zur Bildung eines sog. Amputationsneuroms. Das distale Büngner-Band wird nicht neurotisiert, bleibt jedoch über Jahre erhalten. Atrophische Muskelfasern, die mehr als zwei Jahre dennerviert bleiben verlieren ihre strukturellen Merkmale und degenerieren allmählich. (Modifiziert nach Mummenthaler M, 1998).

Gleichzeitig mit der anterograd gerichteten Waller-Degeneration im distalen Axonabschnitt kommt es proximal der Läsionsstelle zu der sogenannten retrograden Degeneration, welche sich jedoch nur über wenige Segmente erstreckt (Seckel, 1990).

Das richtungsabhängig ungleiche Ausmaß der Degeneration führt letztendlich zu einer Atrophie des distalen Axonstumpfes, während der proximale Teil seine Kontinuität zum neuronalen Perikaryon behält.

Im proximalen Anteil erfolgt - meist im Bereich eines ehemaligen Schnürrings - eine kolbige Auftreibung, welche als Wachstumskolben bezeichnet wird, und von der meist mehrere Axonsprosse (sprouts) ausgehen. Die erfolgreiche Regeneration des Nervens und die damit verbundene Reinnervation des Endorgans hängen nun entscheidend von dem Erreichen des distalen Stumpfes durch einen Axonspross ab. Dies wird zum Teil durch proliferierende SC am distalen Axonabschnitt erleichtert, welche pilzförmig in Richtung des proximalen Stumpfes auswachsen. Wird der distale Axonstumpf durch vom proximalen Axonabschnitt neu aussprossende Nervenfasern erreicht, wachsen die Sprosse in die Büngner-Bänder ein, welche ihnen auf ihrem weiteren Weg als Leitschiene dienen.

Die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration liegt nach Angaben verschiedener Autoren zwischen 0,5 und 6 mm am Tag (Fansa H, 2003). Dabei werden schnellere Regenerationszeiten am proximalen Nervenabschnitt gemessen, welche mit zunehmender Entfernung zum neuronalen Zellkörper abnimmt, so dass sich durchschnittliche Regenerationsgeschwindigkeiten von ungefähr 1-2 mm pro Tag ergeben. Weiterhin weist die Regenerationsgeschwindigkeit eine Abhängigkeit zur Dicke und dem Typ der Nervenfasern auf (Von Korff N, 1992). Der Erfolg einer Nervenregeneration lässt sich an bestimmten Kriterien bestimmen. Zum einen zeigt die Anzahl und das Kaliber der regenerierten Axone den Erfolg der Regeneration an; dies lässt sich mikroskopisch auswerten. Zum anderen ist der Grad der Myelinisierung und die Sklerosierung des Endoneuriums mit Ersatz der SC durch Bündel dünner Kollagenfasern ein Anzeichen für eine erfolgte Regeneration. Weiterhin lassen sich Nervenleitgeschwindigkeiten bestimmen und funktionelle Tests geben entscheidende Hinweise auf eine erfolgreiche Regeneration.

Für die Gewährleistung einer erfolgreichen Regeneration des peripheren Nervens ist außerdem die ausreichende Versorgung des Nervens mit Sauerstoff, Glucose, Elektrolyten, Vitaminen und anderen essentiellen Nährstoffen essentiell. Zudem verlangt eine korrekte Ausdifferenzierung der Nervenfasern nach einer langfristigen funktionellen Wechselwirkung (cross talk) zwischen regenerierenden Nervenfasern und ihren peripheren und zentralen Verbindungen.

Ein komplexes Zusammenspiel aus Wachstumsfaktoren, chemischen Faktoren, Zelladhäsionsmolekülen und der extrazellulären Matrix steuert die axonale Regeneration.

1. Neurotrophe Faktoren

Neurotrophe Faktoren haben entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung, Differenzierung und das Überleben von Neuronen im peripheren und zentralen Nervensystem. Zu den neurotrophen Faktoren zählen:

- a) Neurotrophine, einschließlich Nerve Growth Factor (NGF) und Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF),
- b) Neuropoetische Zytokine, darunter Interleukin-6 (IL-6) und Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) (Boyd und Gordon, 2003).
- c) die Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) – Familie, darunter GDNF und Neurturin (NRTN),
- d) Immunophiline.

Neurotrophe Faktoren und deren Rezeptoren werden nach Nervenläsionen vermehrt exprimiert. Das zielgerichtete Wachstum der Nervenfasern lässt sich durch Wachstumsfaktoren erklären, welche am proximalen -und in noch stärkerer Konzentration am distalen Nervenstumpf- sezerniert werden. Das entstehende Konzentrationsgefälle ermöglicht die Neuorientierung der regenerierenden Axone. Unterschiedliche neuronale Subpopulationen erfordern spezifische trophische Faktoren aus ihren Zielgebieten. Diskutiert wird die antiapoptotische Wirkung neurotropher Faktoren in den Ganglienzellen: Der axonale Kontakt zu neurotrophen Faktoren und deren retrograder Transport zu den Nervenzellkörpern trägt wesentlich zum Überleben der Neurone bei und stellt dadurch die Voraussetzung für die axonale Regeneration dar (Oppenheim et al., 1995).

Zusammenfassend unterstützen neurotrophe Faktoren die neuronale Regeneration durch Wachstumsverstärkung und Faserorientierung. Trotz dieser positiven Eigenschaften werden diese Substanzen bisher klinisch außerhalb experimenteller Studien nicht eingesetzt. Vor dem breiten klinischen Einsatz sind offene Fragen zu Dosierung, Spezifität, Applikationsform, Toxizität und Kanzerogenität zu klären.

a) Neurotrophine Wachstumsfaktoren

Der Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor; NGF) galt lange Jahre als der Prototyp aller Wachstumsfaktoren. Mit der Klonierung des Brain derived neurotrophic factor (BDNF),

einem aus dem Hirn stammenden Wachstumsfaktor, wurde die Vermutung bestätigt, dass es sich um eine ganze Familie handeln musste.

Heute werden die Wachstumsfaktoren dieser Familie als Neurotrophine bezeichnet. Fast alle Neurotrophine werden im distalen Stumpf produziert, proximal aufgenommen und dann retrograd in das Soma transportiert. Sie binden dort an einen Tyrosinkinase-Rezeptor und aktivieren diesen. Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt eine Signaltransduktions-Kaskade in den geschädigten Zellen in Gang, welche zu einer Änderung der zellulären Genexpression führt (Butte MJ, 2001). Diese Signalwege werden unmittelbar nach Verletzung des Axons aktiviert.

b) Zytokine

Eine weitere auf die Nervenregeneration sich einwirkende Gruppe stellen die neuropoetischen Zytokine dar. Als Zytokine werden lösliche Proteine bezeichnet, die durch die Zellteilung aktivierende Wirkung nicht nur auf axonales Wachstum, sondern auch auf zelluläres Überleben von Neuronen haben. Zu den Zytokinen werden unter anderem die Interleukine, Onkostatin M, GM-CSF und der Tumor-Nekrosefaktor gezählt. Zytokine gehören zu den Mediatormolekülen inflammatorischer Prozesse und haben in dieser Hinsicht eine wichtige Bedeutung bei der Waller–Degeneration. So spielt zum Beispiel der Tumornekrose-Faktor eine wichtige Rolle bei der Makrophageneinwanderung und hat damit indirekt einen Einfluss auf die Phagozytose und damit den Abbau des distalen Axonabschnitts, welcher für erfolgreiche Regenerationsprozesse obligat ist (Shamash S, 2002). Zytokine haben weiterhin eine positive Wirkung auf den Erhalt des amputierten Nervenzellkörper. Sie stimulieren das Aussprossen der Neuriten aus dem proximalen Stumpf (sprouting), das Aussprossen von Kapillaren und erhöhen die Motilität und Proliferation der SC und Fibroblasten.

c) Transformierende Wachstumsfaktoren/GDNF-Familie

Des Weiteren ist noch die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren zu nennen, ihr gehören ca. 30 Mitglieder an. Sie alle sind potenzielle Überlebensfaktoren für motorische aber auch sympathische und parasympathische und sensible Neuronen. Diese Wachstumsfaktoren werden retrograd rezeptorvermittelt transportiert und nach Läsionen hochreguliert (Hoke A, 2003). Neben neuronalen GDNF-Quellen konnte ihre Bildung auch in Muskelzellen und SC nachgewiesen werden. Ein wichtiger Vertreter dieser Familie stellt hier der Glial Cell Derived Neurotrophic factor (GDNF) dar. GDNF ist strukturell der Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Familie zuzuordnen und wirkt über die Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase.

GDNF und das ebenfalls zur GDNF-Familie gehörige NRTN spielen bei der Entwicklung parasymphischer Neurone eine wichtige Rolle. Während GDNF die frühe Entwicklung parasymphischer Ganglien während der Embryonalentwicklung fördert, unterstützt NRTN die postnatale Innervation der parasymphischen Zielorgane (Airaksinen MS and M Saarna, 2002).

In Bezug zu dieser Arbeit, welche die Regeneration erektiler Nervenfasern beschreibt, stellt GDNF einen äußerst wichtigen Faktor dar. GDNF mRNA wird im Penis adelter Ratten exprimiert. I¹²⁵-markiertes GDNF wird nach intrakavernöser Injektion in parasymphische und sensorische Neurone retrograd transportiert (Laurikainen A, 2000). Diese Experimente haben erstmals die neurotrophische Wirkung von GDNF auf erektile Nerven nachgewiesen. In Experimenten wurden SC durch retrovirale Vektoren mit GDNF transfiziert, so dass sie GDNF um den Faktor 1000 vermehrt produzierten. Diese GDNF überproduzierenden SC wurden in definierter Konzentration in Silikonleitschienen eingebracht und nach bilateraler kavernöser Nervensegmentexzision zwischen die Nervenstümpfe interponiert (May F, 2004). Auf diese Weise wurde ein spezifischer erektionsfördernder neurotrophischer Faktor über mehrere Monate vermehrt produziert, der unmittelbar an der Läsionsstelle die Nervenregeneration beschleunigt. Die erektile Funktion wurde drei Monate -bei Relaparotomie- durch seitengetrennte Neurostimulation und kavernöse Druckmessung überprüft. Es wurde eine hohe erektile Funktionsrate von 95% festgestellt. Korrespondierend zum funktionellen Ergebnis ergab die neuropathologische Untersuchung das morphologisch beste Ergebnis in Leitschienen mit GDNF-überexprimierenden SC. Diese Regenerate bestanden aus relativ großen Faserbündeln, die überwiegend myelinisiert und von einem dichten mehrschichtigen Perineurium umgeben waren.

d) **Immunophiline**

Immunophiline, die als spezifische Liganden für immunsuppressive Substanzen wie FK506 und Cyclosporin A wirken, fördern die Regeneration kavernöser Nerven bei der Ratte (Sezen SF, 2001). Dieser Effekt auf das Nervenwachstum ist unabhängig von der immunsupprimierenden Wirkung. Immunophiline wirken inhibitorisch auf Calcineurin, eine Proteinphosphatase, die im Nervensystem abundant vertreten ist und das wichtigste Calmodulin-Bindungsprotein im ZNS darstellt. Die zentrale Rolle von Calcineurin bei der Regulation des intrazellulären Calciumspiegels macht dieses Protein zu einer pleomorphen Substanz mit einer Vielzahl von Einflüssen auf die Genexpression von Zytokinen,

Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. In vitro stimulieren Immunophiline das Wachstum SC (Fansa H, 1999).

GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor	Von SC prod. Wachstumsfaktor ↓Neuronentod nach Läsion
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	Stammt aus Gehirn; ↓ Zelldegenerations- apoptoseprogramme
CAM	Cell adhaesion molecules	Zelladhäsionsmoleküle, Oberflächenmoleküle, die Zellkontakte vermitteln
GGF	Glial growth factor	Glialer Wachstumsfaktor, ↑ Proliferation, Migration und Motilität aller Gliafaktoren
TGF	Transforming growth factor	Transformierender Wachstumsfaktor, Kompetenz- faktor
TNF	Tumornekrosefaktor	Antagonisierende Wirkung auf Wachstumsfaktoren
PDGF	Platelet derived growth factor	Plättchen-Wachstumsfaktor
TrkR	Tyrosinkinase Rezeptor	Hormonrezeptor mit ligandenaktivierter Tyrosin- Kinase zur Autophosphorylierung von Tyrosinreste
NT	Neurotrophin	Neurotrophe Faktoren, ↑ Überleben von Neuronen durch Unterdrückung von Zelltodprogrammen
NGF	Nerve growth factor	↓ Zelldegenerationsapoptoseprogramme, ↑ Neuronenwachstum, Differenzierung
IGF	Insulin-like growth factor	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor, Progression-, Proliferations- differenzierungsfaktor
IL	Interleukin	Proteine von unterschiedlichem Aufbau mit mitogener und differenzierender Wirkung
GM CSF	Granulocyte-macrophage colony	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GMF	Glial maturation factor	Gliareifungsfaktor
GAP- 43	Growth-associated Protein 43	wachstumsassoziiertes Phosphoprotein, lokal. im Wachstumskonus und in SC
FKBP	FK 506 binding protein	Immunophilin

Tab.1 Übersicht Wachstumsfaktoren /Funktion in der Regeneration peripherer Nerven.

2. Zelladhäsionsmoleküle

Erreicht ein Axon sprout das dazugehörige Endorgan, können sich andere regenerierende Axone an diesem „Pionieraxon“ orientieren und mit ihm Faszikel bilden.

Das „Pionieraxon“ selbst ist bei seiner Suche auf differenzielle Adhäsion zu Strukturen in seiner Umgebung angewiesen. So bilden zum Beispiel Gliazellen (Siebert H, 2003) oder auch die Basalmembran solche Kontaktpunkte („guided posts“). Diese Kontakte werden durch Adhäsionsmoleküle vermittelt und verhindern ein zielloses Herumirren aussprossender Axone. Adhäsionsmoleküle werden in drei Familien unterteilt:

- Immunglobuline (z.B. N-CAM, L1 und MAG),
- Integrine,
- Cadherine (z.B. N-Cadherin).

Das N-Cadherin wird nach einer Nervenläsion von SC vermehrt synthetisiert. Es ist auf der einen Seite zuständig für die Zelladhäsion zwischen SC und stabilisiert dadurch das Büngner-Band, welches dem aussprossendem Axon die zielführende Richtung gibt. Auf der anderen Seite vermittelt es aber auch die Kontakte zwischen SC und aussprossendem Axon und „begleitet“ es dadurch zu seinem Weg zum Ziel (Fansa H, 2003).

3. Extrazelluläre Matrix

Aussprossende Axone bewegen sich meist chemotaktisch getrieben fort. Es findet eine Kontaktführung statt, bei welcher der Wachstumskegel spezielle Substrate bevorzugt bzw. vermeidet. So können bestimmte Stoffe das Axonwachstum extrem steigern, andere hingegen bringen das Wachstum zum Erliegen. Im Labor konnten für einige Stoffe, wie zum Beispiel Laminin, Fibronectin, Heparinsulfat-Proteoglycan oder Kollagen IV, eine wachstumsfördernde Wirkung auf Axone gezeigt werden. Diese Stoffe werden zum Teil in vivo von SC, Fibroblasten und dem Neuron selbst gebildet (Fansa H, 1999; Ide C, 1996).

:

2.4. Stickstoffmonoxid

2.4.1 Überblick

Die penile Erektion wird durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt. Bei sexueller Stimulation wird lokal NO im Corpus cavernosum synthetisiert und freigesetzt, was über einen komplexen Mechanismus zur Entspannung der Gefäßmuskulatur und damit zur erhöhten Blutzufuhr der Corpora cavernosa führt. Dieser Blutandrang verursacht durch Zunahme der Tumescenz und Rigidität des Penis eine Erektion.

NO bildet ein physiologisches Signal des Menschen und ist unter anderem unentbehrlich bei der Signalübertragung, die eine Erektion auslöst. Reduzierte NO-Synthese oder reduzierte NO-Freisetzung aus dem erektilen Gewebe gehen gewöhnlich mit einer erektilen Dysfunktion einher. Weiterhin kommen NO bedeutende Aufgaben bei der neuronalen Degeneration und bei regenerativen Prozessen zu. NO, welches früher auch als „Endothelium derived relaxing factor“ bezeichnet wurde, entsteht während der Oxidation L-Arginins zu L-Citrullin. Die lokalen Wirkungen von NO sind vielfältig. NO kommt die Rolle eines vielerorts vorkommenden multifunktionalen Mediators des menschlichen Körpers zu.

Im zentralen und peripheren Nervensystem, im Skelettmuskel, in der Macula densa der Niere und in den Hoden bildet die neuronale NOS (nNOS) das vorherrschende Enzym für die Bildung von NO. Das durch die nNOS synthetisierte NO tritt als Neurotransmitter, als Neuromodulator und als intrazelluläres Signalmolekül auf. Es ist ebenfalls involviert in der synaptischen Plastizität, der Regulation der Genexpression, sowie bei der Entwicklung, Differenzierung und der Regeneration von Nervenzellen. NO spielt somit eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Prozessen (Saur D, 2004).

So kommt es zum Beispiel in der glatten Gefäßmuskulatur bei einer Erhöhung der NO-Konzentration zu einer Relaxation bevorzugt der Venen und großen Koronararterien. Weiterhin kommt NO aber auch eine Rolle in der Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Dilatation der Bronchialmuskulatur und der Immunabwehr zu. Das lokal wirkende, endogene NO wird nur aus ungeschädigtem Endothel freigesetzt. So ist zum Beispiel bei einem durch Arteriosklerose geschädigtem Endothel der resultierende lokale NO-Mangel nicht mehr zu kompensieren.

NO spielt durch seine auf die Gefäßmuskulatur relaxierende Wirkung eine entscheidende Schlüsselrolle in der Botenstoffkaskade, die für die Erektion verantwortlich ist. So wird NO anhand zahlreicher Studien (z.B. Pickard R (1996)), als der entscheidende periphere

relaxierende Neurotransmitter bezüglich der Erektion des Mannes bezeichnet. Dies wird durch mehrere experimentelle Studien verdeutlicht.

Mehrere Studien bedienen sich der elektrischen Stimulation der kavernösen Nerven (Eckhard C, 1863), welche zuverlässig eine Erektion auslöst, um Konzentrationsmessungen von NO durchzuführen und dessen Bedeutung in diesem Zusammenhang zu erforschen. So konnte sowohl anhand tierexperimenteller Arbeiten an Hasen, Kaninchen, als auch beim Menschen, gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten Freisetzung von NO nach elektrischer Stimulation der Nervi erigentes kommt (Pickard RS, 1995; Hayashida H, 1996). Weiterhin sprechen Studien, bei denen es nach Gabe von NOS-Inhibitoren trotz elektrischer Stimulation nicht zu einer Erschlaffung der glatten kavernösen Muskulatur -und damit zu keiner Erektion kam, für die entscheidende Stellung von NO.

Auch kommt es bei Verabreichung von Substanzen, welche vermehrt die NO-Abgabe fördern, wie zum Beispiel Glyceryltrinitrate, zu einem in der glatten Muskulatur des Corpus cavernosum stark relaxierenden Effekt (Burnett AL, 1995) und damit zu einer Erleichterung der Erektion. Auch die Phosphodiesterasehemmer wie Sildenafil wirken über eine NO-Erhöhung, indem sie die NO abbauende Phosphodiesterase hemmen und damit die NO-Konzentration erhöhen.

2.4.2 Funktionszyklus Stickstoffmonoxid

Die penile Erektion wird durch NO vermittelt, welches eine Erschlaffung der glatten Muskeln der Schwellkörper verursacht. Durch die Relaxation der glatten Gefäßmuskelfasern werden die Schwellkörper vermehrt mit Blut gefüllt, und es kommt zu einer vermehrten Tumescenz und Rigidität der Schwellkörper.

Die Enzymkaskade läuft über mehrere Zwischenstufen ab. Den Anfang der Kaskade bildet NO, welches aus Nervenendigungen und Endothelzellen freigesetzt wird. Durch die erhöhte Konzentration von NO an den glatten Muskelfasern des Corpus cavernosum wird die Guanylatcylase stimuliert, die daraufhin aus GTP (Guanosintriphosphat) cGMP (cyclic guanosine monophosphate) synthetisiert und damit den cGMP-Spiegel erhöht (siehe Abb.9). Die Erhöhung der cGMP-Konzentration bewirkt einen vermehrten Rücktransport von Kalzium in die Zelle und eine gesteigerte Aufnahme von Kalzium in die entsprechenden Speicher. Die Abnahme der Kalziumkonzentration wird durch cGMP durch Aktivierung einer Proteinkinase, der „Proteinkinase G“ erreicht.

Weiterhin steuert cGMP Ionenkanäle und Phosphodiesterasehemmer, welche zusätzlich eine Auswirkung auf den intrazellulären Kalziumspiegel haben (Ghalayini IF, 2004). Durch einen

verminderten zytosolischen Kalziumspiegel kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Schwellkörpermuskulatur und der daraus resultierenden Erektion. Das cGMP-Signal wird durch eine Phosphodiesterase beendet, welche den second messenger zu GMP hydrolysiert. An dieser Stelle greifen Phosphodiesterasehemmer, welche den cGMP-Spiegel durch Verlangsamung des Abbaus von cGMP anheben und damit die Erschlaffung der glatten Schwellkörpermuskulatur verlängern.

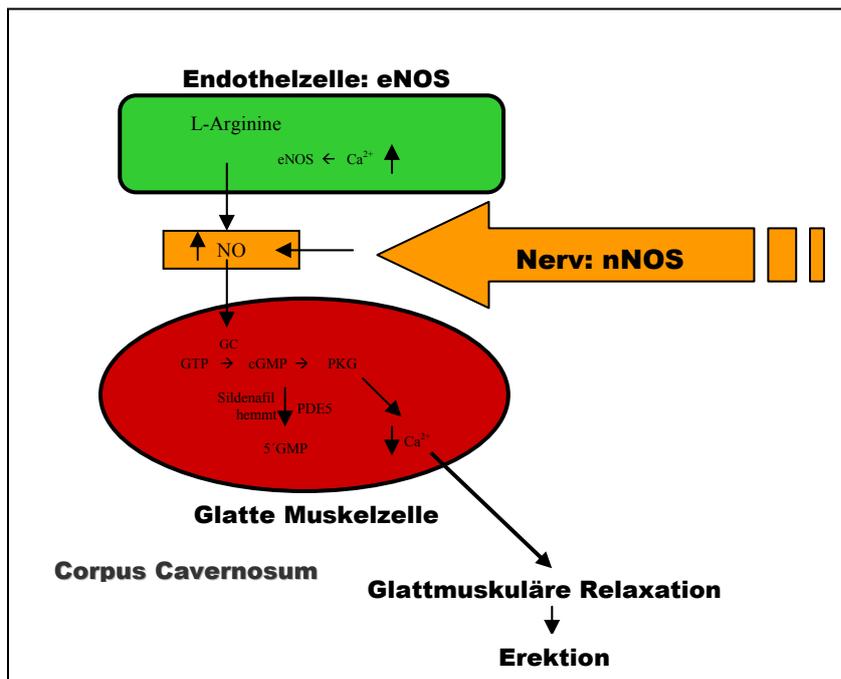


Abb. 9 : Funktionszyklus Stickstoffmonoxid : eNOS (endotheliale Stickstoffsynthase), nNOS (neuronale Stickstoffsynthase), GTP (Guanosintriphosphat), cGMP (cyclic guanosine monophosphat), PKG (Proteinkinase G), PDE (Phosphodiesterase).

Die Enzymkaskade, die schließlich zur Erektion führt, ist somit im Detail bekannt und bietet dadurch mehrere Angriffspunkte, um eine Verbesserung der erektilen Funktion mit Hilfe von gentherapeutischen Maßnahmen zu erreichen. Es wurden in letzter Zeit vielversprechende - durch tierexperimentelle Untersuchungen gewonnene - Ergebnisse erzielt, die derartige theoretische Ansätze belegen (Chancellor MB, 2003).

2.4.3 Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthase

NO wird nach Bedarf durch diverse Stickstoffmonoxidsynthasen gebildet. Es konnten weder Speicherorte, noch eine Anreicherung in Vesikeln nachgewiesen werden. Vom Ort der Synthese verteilt sich das sehr membranpermeable NO, welches eine sehr kurze Halbwertszeit

(0,1-6 s) hat, durch Diffusion. NO wird bei der Hydroxylierung von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet.

Drei verschiedene Isoformen des Enzyms NOS (NOS) katalysieren diese Reaktion.

- Typ I : neuronale NOS (nNOS)
- Typ II: (Makrophagen) induzierende NOS (iNOS)
- Typ III: endotheliale NOS (eNOS)

Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer Funktion und der Quantität an NO, welches durch sie synthetisiert wird. Während eine leichte Erhöhung von NO durch die nNOS bzw. die eNOS eine große Anzahl an regulativen Aufgaben vermittelt, übernimmt die iNOS durch eine starke Erhöhung von NO hauptsächlich immunologische Prozesse. Im Nervensystem sind sie jedoch alle zu finden. Alle drei Formen des Enzyms werden durch ein Gen kodiert, welches beim Menschen auf Chromosom 7 (eNOS), 12 (nNOS), 17 (iNOS) kodiert ist (Keilhoff G, 2003). Die Lokalisation der verschiedenen NOS-Typen kann mit Hilfe der Immunhistochemie unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Burnett AL, 1995). Des Weiteren können die unterschiedlichen NOS-Typen mit Hilfe der Real time-RT-PCR (siehe 2.6) quantifiziert werden. Diese Quantifizierung wird relativ zu im Gewebe vorkommenden Markern angegeben. Je nach Fragestellung wird die Quantifizierung zu einem bestimmten Marker bestimmt. Die global vorkommende Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Marker des Gesamtgewebes und wird verwendet, wenn der Anteil der NOS in Relation zum gesamten Gewebe bestimmt werden soll. Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5) dagegen stellt einen für neuronales Gewebe spezifischen Marker dar.

Typ I : neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS)

Den Typ I, die nNOS findet man im Nervengewebe des Corpus cavernosum, im pelvinen Plexus, im Hypothalamus sowie in spinalen Kernen (Ferrini MG, 2003).

Die Kontrolle der erektilen Funktion bedarf einer Koordination des Hypothalamus und der L6-S1-Region des Rückenmarks und einer Aktivierung der nNOS (Ferrini MG, 2003). Die nNOS, welche Kalzium und Calmodulin abhängig operiert, spielt die größte Rolle in dem Signalzyklus der Erektion (Burnett AL. 2004). Sie wird auch als penile nNOS bezeichnet.

Typ II: (Makrophagen) induzierende Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS)

Die Stickstoffmonoxidsynthase, die in der glatten Muskulatur außerhalb des Nervengewebes gefunden wird, wird als inducible NOS (iNOS) oder Typ II bezeichnet. Sie arbeitet kalziumunabhängig. Die Induktion der iNOS kann durch bestimmte Zytokine bzw. bakterielle Endotoxine erfolgen (Alderton WK, 2001).

Typ III: endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)

Typ III stellt die Stickstoffmonoxidsynthase dar, welche im endothelialen Gewebe zu finden ist. Sie ist wie die nNOS abhängig von einer Induktion durch Kalzium und Calmodulin. Die NOS-Isoformen, die im penilen Gewebe zu finden sind, werden im Allgemeinen als penile NOS (PNOS) bezeichnet und gemäß der oberen Einteilung in PnNOS, PiNOS und PeNOS eingeteilt.

Die Synthese von NO durch nNOS und eNOS ist im Gegensatz zu iNOS abhängig vom intrazellulären Kalziumspiegel. Die Aktivität aller drei Isomerasen hängt von der Bindung an Calmodulin ab. Ein Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels führt zu einem erhöhten Calmodulinspiegel. Die vermehrte Bindung von Calmodulin an eNOS und nNOS führt zu einer transient vermehrten NO-Produktion. Dagegen bindet iNOS schon bei sehr geringen intrazellulären Kalziumkonzentrationen an Calmodulin. Die NO-Produktion durch iNOS hält länger an und führt zu höheren NO-Konzentrationen in der Zelle. Die Produktion von NO durch iNOS wird durch Transkription kontrolliert. In den meisten Zellen sind iNOS Proteinkonzentrationen entweder sehr niedrig oder unterhalb der Nachweisgrenze. Die Stimulation durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren kann jedoch zur vermehrten Transkription des iNOS Gens und relativ hoher NO-Produktion führen.

Die Stickstoffmonoxidbildung aus L-Arginin wird sowohl über die Substrate (L-Arginin), über die Aktivität der NOS und über die quantitative Expression der NOS gesteuert. Die Aktivität der NOS wird unter anderem rezeptorgesteuert reguliert. So finden sich aktivierende Rezeptoren, wie der NMDAR-Rezeptor, als auch inhibierende Rezeptoren, wie der PIN-Rezeptor (Magee TR, 2003) (siehe Abb. 10). Der NMDAR (N-methyl-D-aspartate-receptor) sowie der PIN (Protein inhibitor of NOS) konnten im pelvinen Ganglion, in den kavernenösen Nerven, sowie im Hypothalamus nachgewiesen werden und gewährleisten eine exakte Steuerung der NOS-Expression (Magee TR, 2003).

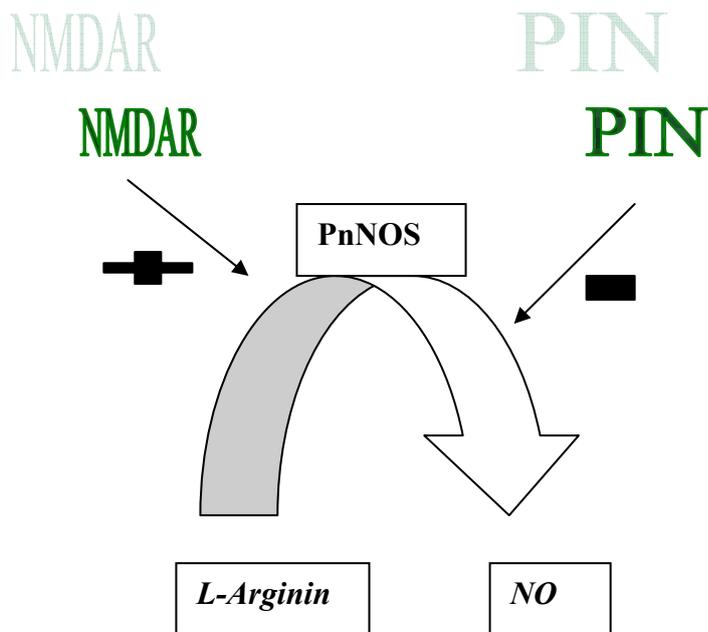


Abb.10 Rezeptorvermittelte Aktivitätssteuerung penilen nNOS. Die Aktivität der NOS wird unter anderem rezeptorgesteuert reguliert. So finden sich aktivierende Rezeptoren, wie der NMDAR-Rezeptor, als auch inhibierende Rezeptoren, wie der PIN-Rezeptor.

2.4.4 Rolle der Stickstoffmonoxidsynthase beim Erektionsprozess und beim Erhalt der Erektionsfähigkeit

In zahlreichen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die nNOS die entscheidende Rolle bei der Signalübertragung der Erektion spielt. Ist ihre Konzentration stark vermindert, kommt es zu keiner Erektion (Burnett AL, 2004). Selbst medikamentöse Therapien mit Phosphodiesterasehemmern können bei ungenügend hoher Konzentration von nNOS keine Erektion mehr bewirken. So zeigten Tierversuche mit Ratten, die mit Sildenafil behandelt und deren kavernöse Nerven elektrisch stimuliert wurden, bei Tieren mit einer verminderten nNOS-Expression einen erheblich verminderten kavernösen Druckanstieg gegenüber Tieren mit natürlicher Konzentration an nNOS. Bei Ratten mit verminderter eNOS Konzentration konnte dagegen keine Verminderung des kavernösen Druckanstiegs bei Stimulation festgestellt werden (Cashen DE, 2002). Dies legt nahe, dass die Aktivität der nNOS sehr wichtig für eine Auslösung der Erektion ist.

Die Ausschüttung bzw. Synthese von NO durch die nNOS aus Nervenendigungen führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und zur Initiierung der Erektion. Im Verlauf wird dadurch auch die eNOS aktiviert, die ebenfalls eine Rolle im Erhalt der Erektion spielt (Burnett AL, 2004).



Abb.11 Erektionsvorgang, Rolle der NOS-Isoformen. Die nNOS spielt eine entscheidende Rolle in der Initiierung des Erektionsprozesses, während der eNOS Funktionen im Erhalt der Erektion zukommen.

Auf der anderen Seite muss betrachtet werden, wie sich die Konzentrationen der NOS nach Nervenschäden bzw. Deinnervation verhalten. So konnte in mehreren Tierversuchen an Ratten gezeigt werden, dass es bei Nervenschäden an kavernen Nerven, wie sie zum Beispiel bei einer radikalen Prostatovesikulektomie vorkommen, zu einer Änderung der NOS-Konzentrationen im Schwellkörpergewebe kommt.

Bei einem Tierversuch wurden bilateral die Nervi erigentes durchtrennt und nach einer bestimmten Zeit die nNOS- bzw. die eNOS-Konzentration durch RT-PCR (Real Time-PCR), Western plot, immunhistologische Nachweismethoden und in situ Hybridisierung bestimmt. Quantifizierungen wurden jeweils eine, zwei und drei Wochen nach Durchtrennung der kavernen Nerven durchgeführt. Schon eine Woche nach Deinnervation konnte ein drastischer Rückgang der nNOS-Konzentration festgestellt werden. Diese Konzentrationserniedrigung setzte sich bei längerer Deinnervationszeit noch fort. Bei den zwei anderen NOS-Isoformen wurden dagegen keine signifikanten Änderungen festgestellt (Podlasek CA, 2001). Zusätzlich fiel auf, dass es zu einer Atrophie des Gewebes der glatten Muskulatur und des Endothels des Schwellkörpers kam.

Bei einer Studie nach Carrier S, 1995 unterteilte man die Ratten noch zusätzlich in unilaterale bzw. bilaterale Nervenexzision der kavernen Nerven. Weiterhin wurde eine Vergleichsgruppe untersucht, bei der die Tiere nur eine Laparatomie erhielten, ohne dass erektile Nerven beschädigt wurden. Tiere der unterschiedlichen Gruppen wurden jeweils drei Wochen und sechs Monate nach Laparatomie mit bzw. ohne Nervenexzision nach NOS-positiven Nervenfasern untersucht. Die Ergebnisse der Ratten mit unilateraler und bilateraler Nervendurchtrennung nach drei Wochen waren auf der geschädigten Seite ähnlich. Im Schwellkörper kam es zu einem drastischen Rückgang des nNOS-positiven Gewebes. Untersuchte man Ratten sechs Monate nach Durchtrennen und Teillexzision der kavernen

Nerven, wiesen die Tiere, die eine unilaterale Schädigung des Nervens erhalten hatten, fast normale Werte für die nNOS-Präsenz auf, während Tiere mit einer bilateralen Schädigung keine Veränderung zu Tieren drei Wochen nach Deinnervation zeigten. Das nNOS positive Gewebe bleibt demnach bei totaler Deinnervation bei seinem niedrigen Level, während sich bei Teilinnervation des Corpus cavernosum das nNOS-Vorkommen nach einer gewissen Erholungsphase nach einem starken Absinken wieder erhöht. Bei unilateraler Innervation wurde nach sechs Monaten ähnlich viel nNOS positives Gewebe gefunden, wie bei Ratten, die als Vergleichsgruppe (Sham) dienen und nur eine einfache Laparatomie erhielten (Carrier S, 1995).

Zusätzlich wurden simultan kavernöse Druckmessungen nach elektrischer Stimulation der erektilen Nerven durchgeführt. Bei bilateraler Schädigung konnte weder nach drei Wochen noch nach einem halben Jahr ein Druckanstieg im Schwellkörper nachgewiesen werden. Bei den einseitig geschädigten Ratten konnte man bei Stimulation des intakten Nervens drei Wochen nach Durchtrennung eine Verringerung des Schwellkörperdruckanstieges feststellen, während man bei sechs Monaten sogar eine Druckerhöhung gegenüber der Kontrollgruppe (Sham) feststellte (Carrier S, 1995).

Die Ergebnisse dieser Studien korrelieren mit den Erfahrungen, die man bei der radikalen Prostatovesikulektomie gemacht hat. Bei vielen Patienten mit unilateraler Nervenschädigung, - d.h. mindestens ein neurovaskuläres Bündel wurde bei der Operation erhalten - kommt es anfänglich zur totalen erektilen Dysfunktion. Bei vielen Patienten, die eine nervenschonende Therapie erhielten, zeigt sich dann aber im Verlauf eine langsame Rehabilitation der erektilen Funktion. Dies kann oft 6-18 Monate in Anspruch nehmen. Bei Patienten, bei denen zum Beispiel aus onkologischen Gründen eine bilaterale Exzision erfolgte, ist hingegen auch nach Jahren keine erektile Funktion zu erwarten.

So liegt die Vermutung nahe, dass das Vorkommen von nNOS positivem Gewebe eine sehr wichtige Rolle in Hinsicht auf die erektile Funktion darstellt. Eine Deinnervation kann hierbei zu extremen Konzentrationserniedrigungen der NOS führen, die sich aber bei ausreichender Innervation über verbliebene neurovaskuläre Bündel wieder erholen kann und so die Nervenschädigung ausgleicht. Voraussetzung bleibt, wie man bei der bilateralen Schädigung sehen kann, eine Teilinnervation bzw. eine zeitnahe Wiederherstellung der axonalen Kontinuität.

2.4.5 Apoptoseregulation durch Stickstoffmonoxidsynthasen in neuronalen Zellen und im Corpus cavernosum

NO, ein Biomolekül dem eine extreme Vielfalt an Funktionen zukommt, spielt weiterhin eine entscheidende Rolle bei der Nervenregeneration und der neuronalen Degeneration. In Studien zeigte sich ein protektiver Effekt von NO auf geschädigte Nervenfasern (Thippeswamy T, 1997) und eine starke Auswirkung sowohl auf die Nervenregeneration (Cristino L, 2000) als auch auf die Apoptose von Nervenzellen (Heneka M.T., 1998). NO kann somit Apoptose induzieren als auch inhibieren (Chung HT, 2001).

Apoptosehemmung

Verschiedene Signalwege führen zur Apoptosehemmung durch NO:

- (1) NO verhindert apoptotischen Zelltod durch S-Nitrosylierung von proapoptischen Proteinen wie zum Beispiel Proteine aus der Kaspase-Familie (Chung HT, 2001),
- (2) NO induziert die Expression verschiedener zytoprotektiver Gene (z.B. heat shock protein (HSP 70/32)) (Kim Y.M,1997),
- (3) NO reguliert das Level der antiapoptisch wirkenden Bcl-2-Proteinfamilie (Bidmon HJ, 2001),
- (4) NO inhibiert apoptotische Signale durch cGMP-Erhöhung, indem dadurch eine Suppression der Apoptose induzierenden Cytochrom C Freisetzung erreicht wird (Kwon YG, 2001),
- (5) Die Interaktion von NO mit cGMP führt zur Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen und dadurch zur vermehrten Expression anti-apoptischer Proteine.

Apoptoseinduktion

Folgende Signalwege führen zur Apoptoseinduktion durch NO (Chung HT, 2001):

- (1) Aktivierung von Kaspasen
- (2) vermehrte Produktion von p53
- (3) Interaktion mit Membranlipiden
- (4) Interaktion mit dem mitochondrialen Zellstoffwechsel

Diese komplexen pro- bzw. anti-apoptotischen bioregulatorischen Funktionen von NO sind dosisabhängig und zellspezifisch. Während langdauernde Überproduktion von NO durch Aktivierung von Kaspasen und vermehrte Expression von p53 proapoptotisch wirkt, hemmen niedrige oder physiologische NO-Konzentrationen den durch den Entzug von Wachstumsfaktoren, durch Fas, TNFalpha und Lipopolysaccharide induzierten Zelltod (Chung HT, 2001). Durch die ambivalente Funktion von NO, welches auf der einen Seite eine Apoptose einleiten und unkoordiniert wachsende Nervenfasern eliminieren kann, auf der anderen Seite aber auch neuronale Strukturen schützen kann, wird eine Steuerung der Nervenregeneration durch NO erreicht. Axone, welche ihre zugehörigen distalen SC ansteuern, überleben, während fehlgeleitete durch NO induzierte Apoptose eliminiert werden (Brushart TM, 1993). Bei einer Studie nach Ernst (2000) konnte gezeigt werden, dass NO bei der Elimination fehlgeleiteter Axone beteiligt ist. Eine Studie nach Van Wangenen und Rehder (2001) zeigte dagegen eine wachstumgenerierende und nervenerhaltende Wirkung NO bei der Findung der korrekten Nervenverbindungen (path finding).

2.4.6 Bedeutung der Stickstoffmonoxidsynthase-Isomerasen bei der Regeneration

Neuere Studien unterscheiden zusätzlich die verschiedenen NOS-Isomerasen (s.o.), welche für die NO-Produktion verantwortlich sind.

Hierbei wurden interessante Entdeckungen gemacht. So zeigte eine Studie nach Keilhoff, 2002, dass sich die Regeneration peripherer Nerven bei unterschiedlichem Vorhandensein der NOS-Isoformen deutlich unterschied. Das Fehlen der neuronalen NOS verursachte eine bei weitem schlechtere und verlangsamte Regeneration als das Fehlen einer anderen NOS-Isoform.

Keilhoff wählte für seine Untersuchungen den Nervus ischiadicus von Mäusen, welchen er durchtrennte und sofort danach wieder mikrochirurgisch mit einem Faden adaptierte. Die Tiere wurden dann nach unterschiedlichen Regenerationsperioden perfundiert und histologisch ausgewertet. Dabei wurden drei verschiedene Arten von Mäusen benutzt, (1) Wildtyp, (2) Tiere, deren nNOS stark vermindert war, (3) Tiere, deren eNOS stark vermindert war. Die Ergebnisse unterschieden sich wie oben erwähnt von den verschiedenen Tiergruppen. Ein Fehlen von eNOS bei einer Gruppe hatte eine verspätete Revaskularisierung der Nerven zur Folge. Die Regeneration veränderte sich aber bei dieser Gruppe nicht signifikant. Bei fehlender nNOS dagegen trat ein signifikant erhöhter Zellverlust, eine verlangsamte Waller-

Degeneration und ein deutlich vermehrtes unkoordiniertes Wachstum ein. Die Regeneration war bei diesen Tieren dadurch insgesamt verlangsamt, und es kam zu einer verminderten sensiblen und motorischen Funktion. Bei Folgeuntersuchungen wurde die Regeneration bei einem Defizit von iNOS geprüft, welches zu einer gering verlangsamt Waller-Degeneration führte, jedoch kaum Konsequenzen auf neuronales Überleben hatte (Keilhoff G, 2003).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die reguläre NOS-Aktivität essentiell für das Zellüberleben und die Regeneration nach peripheren Nervenläsionen ist, wobei nach dem spezifischen NOS Typ differenziert werden muss. Der nNOS kommt hierbei die größte Bedeutung zu.

2.5 Nervenrekonstruktion

Das Thema des Versuches einer Nervenrekonstruktion ist schon sehr alt. Bereits im 2. Jahrhundert n.Chr. wurde von Galen eine Nervennaht beschrieben (Terzis JK, 1997). Doch erst sehr viel später, Mitte des 19. Jahrhunderts wurden allmählich die ersten zellulären Mechanismen der Regeneration entdeckt (Büngner O, 1891). Erst damit wurde der Grundstein für ein Verständnis der peripheren Nervenregeneration gelegt und somit neue Möglichkeiten der positiven Beeinflussung bzw. der Rekonstruktion ermöglicht.

Der Heilungsverlauf und die Rückbildung des neurologischen Defizits werden durch das Ausmaß der strukturellen Schäden bestimmt. Die Klassifizierung geht auf Seddon (1943) zurück, der die Begriffe Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis als Ausdruck einer zunehmenden strukturellen Schädigung des Axons und seiner Hüllstrukturen einführte. Als Neurapraxie oder Nervenläsion ersten Grades bezeichnet man eine vorübergehende Schädigung der Myelinscheide, ohne Unterbrechung der axonalen Kontinuität. Läsionen zweiten Grades (Axonotmesis) werden typischerweise durch eine Quetschung von Nervenfasern hervorgerufen, deren distale Axonabschnitte durch die Waller-Degeneration abgebaut werden. Die Prognose ist günstiger als bei einer vollständigen Nervendurchtrennung (Neurotmesis), da bei intakten Neuronscheiden eine zielgerichtete Reinnervation stattfindet.

Bei hochgradigen strukturellen Nervenschäden im Sinne einer Neurotmesis ist die Nervenkontinuität vollständig aufgehoben. Unmittelbare Folge der unterbrochenen neuromuskulären Übertragung ist hier zum Beispiel bei Schädigung der erektilen Faser die erektile Dysfunktion. Metabolische Veränderungen begleiten die Waller-Degeneration und führen zur progressiven Zerstörung des erektilen Gewebes. Histologisch ist eine Atrophie und

Fibrose des Schwellkörpergewebes nachweisbar (Fraiman et al., 1999), die zur veno-okklusiven Insuffizienz führen (Nehra et al., 1996). Experimentelle Denervierungsstudien bei Ratten belegen, dass die Degeneration des erektilen Gewebes mit einem aktiven apoptotischen Prozess assoziiert ist (Klein et al., 1997). Anhand dieser Entdeckungen wird deutlich, wie wichtig eine zeitnahe Wiederherstellung der Axonkontinuität ist. Verschiedene Nervenrekonstruktionsmethoden versuchen diese axonale Kontinuität, unter Anwendung multipler Methoden, zu erreichen.

2.5.1 Autologe Nerventransplantate

Bei autologen Nerventransplantaten wird, um eine Nervenläsion zu überbrücken, körpereigenes Nervenmaterial transplantiert. Dabei werden Teile autologer Nerven mit funktionell geringer Bedeutung entnommen. Beim Menschen wird häufig der N. suralis verwendet, um Läsionen motorischer Nerven zu überbrücken. Hierbei kommt es zwar zu einer Sensibilitätsstörung im Innervationsgebiet des N. suralis, der jedoch in Kauf genommen werden kann, wenn es durch die Transplantation zum Beispiel zu einer Verbesserung der motorischen Funktion kommt. Der große Vorteil der autologen Transplantation ist, dass es, da es sich um körpereigenes Gewebe handelt, zu keiner Abstoßungsreaktion kommt, welche neben zahlreichen anderen Komplikation die Nervenregeneration verhindert.

Autologe Nerventransplantate sind Therapie der Wahl zur Rekonstruktion langstreckiger Nervendefekte, wenn eine direkte Anastomose der Nervenenden nicht möglich ist. Obwohl Nerventransplantate meist zur Rekonstruktion somatischer Nerven sicher und erfolgreich verwendet wurden, wurde ihre Effektivität auch bei autonomen Nerven nachgewiesen (Kono et al., 1998). Bei geringgradigen Nervenläsionen besitzen periphere Nerven die intrinsische Kapazität, sich vollständig zu regenerieren und die Funktion wiederherzustellen. Bei höhergradigen Defekten mit vollständiger Durchtrennung des Nervens und der axonalen Hüllstrukturen fehlt jedoch das Gerüst für eine gezielte Reinnervation des Zielorgans. Diese Leitstruktur versucht man bei kompletten Nervenläsionen zu rekonstruieren. Die Interposition peripherer Nerventransplantate kann prinzipiell als Leitstruktur für die Reinnervation dienen. Innerhalb des Autotransplantats erfolgt die Waller-Degeneration während der folgenden 2-3 Wochen. Bei korrektem Anschluss an den proximalen und distalen Stumpf erfolgt ein Durchwachsen des Transplantats entsprechend der spezifischen axonalen Regenerationsleistung. Die regenerierenden Axone neigen jedoch dazu, nicht durch das Transplantat hindurch zu wachsen, sondern außen entlang und dadurch das Zielorgan zu

verfehlen. In diesem Fall findet keine oder nur eine partielle Wiederherstellung der Funktion statt.

Interessant für diese Arbeit, die sich mit der Rekonstruktion erektiler Nerven beschäftigt, sind präklinische Pilotstudien, bei denen der N. genitofemoralis als Ersatz für exzidierte kavernöse Nerven verwendet wurde (Quinlan DM, 1991; Ball RA, 1992). Hier wurde erstmals gezeigt, dass mittels Nerveninterponaten im Tierversuch eine Wiederherstellung der erektilen Funktion nach Verletzung der kavernösen Nerven möglich ist. Walsh und seine Mitarbeiter versuchten diese Methode auf den Menschen zu übertragen und setzten N. genitofemoralis-Transplantate während mehrerer radikalen Prostatektomien ein (Walsh PC, 1998). Die Prozedur ist bei Menschen im Gegensatz zum tierexperimentellen Versuch bei der Ratte technisch schwieriger durchführbar, da die kavernösen Nerven keine klar definierten Strukturen darstellen, sondern aus mehreren Nervenfasern bestehen, die in einem Geflecht angeordnet sind und von Gefäßen umgeben sind. So konnte Walsh auch nach Monaten postoperativ keine signifikante Besserung der erektilen Funktion durch dieses Verfahren feststellen (Walsh PC, 1998). Dagegen konnte bei einer Studie an 23 Männern mit präoperativ intakter erektiler Funktion nach radikaler Prostatovesikulektomie mit anschließender Nerven transplantation des Nervus suralis nach 13 Monaten eine Erektionsrate von 23% festgestellt werden, welche sich unter medikamentöser Phosphodiesterasehemmergabe noch steigern ließ (Kim ED, 2001).

Der wesentliche Vorteil vitaler Nerven transplantate liegt neben der Spannungsreduktion darin, dass SC die Transplantation überleben und für die regenerierenden Axone ein optimales Wachstumsmilieu schaffen (Frostick SP, 1998). SC überleben durch Diffusion, bis eine Neovaskularisierung stattgefunden hat. Autologe Nerven transplantate haben weitere Vorteile: Das Transplantat ist resorbierbar und permeabel und da das Transplantat aus körpereigenem Gewebe besteht, wird keine Immunreaktion ausgelöst. Der longitudinale Faserverlauf und die Büngner-Bänder im Nerven transplantat eröffnen den regenerierenden Axonen zudem ein komplexes Leitschienensystem.

Autologe Nerven transplantate haben andererseits spezifische Nachteile, welche die oft enttäuschenden Ergebnisse erklären: Da die transplantierten Axone zunächst durch die Waller-Degeneration abgebaut werden müssen, bevor die regenerierenden Nervenfasern von proximal einwachsen können, entsteht ein Zeitintervall, in dem die Axone nicht durch das Transplantat hindurch wachsen, sondern außen entlang und deshalb oft das Zielorgan verfehlen. Experimentell können bessere Ergebnisse erzielt werden, wenn prädegenerierte Transplantate verwendet werden, bei denen die Axone vor der Interposition bereits

enzymatisch abgebaut wurden (Danielsen, 1995). Bedingt durch die Permeabilität des Nerventransplantats hemmt die entstehende intraneurale Narbenbildung die Nervenregeneration und trägt dadurch zum ungerichteten Nervenwachstum bei (siehe Abb. 12). Da die regenerierenden Nervenfasern zwei Nahtlinien überqueren müssen, führt dies zu einem Verlust regenerierender Fasern an jeder Nahtlinie. Da als Spendernerv generell ein sensibler Hautnerv gewählt wird, müssen motorische oder – bei der Rekonstruktion erektiler Nerven – autonome Axone durch eine Umgebung wachsen, die nicht optimal ist und potentiell inhibitorische Wirkung hat. Zudem bestehen nicht prädegenerierte Autotransplantate aus dichten Strukturen, die die Regeneration hemmen. Die dichte Struktur wird durch die zunehmende Fibrosierung verstärkt, die durch die primär fehlende vaskuläre Versorgung bedingt ist. Von Nachteil sind weiterhin der operative Mehraufwand durch die Zweitoperation und das entstehende neurologische Defizit an der Entnahmestelle.

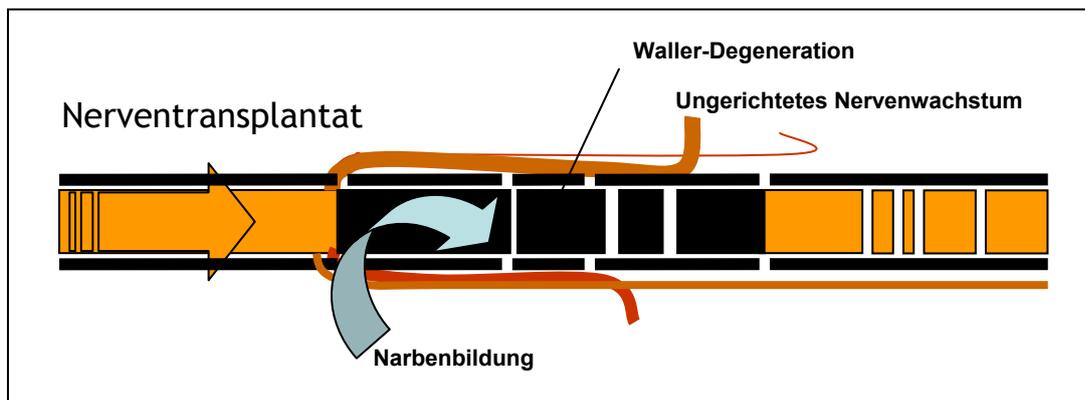


Abb. 12 Darstellung der Nervenregeneration über Nerventransplantate. Bevor die wiederaussprossenden Axone in das transplantierte Nervenfragment einwachsen können, müssen die transplantierten Axone durch die Waller-Degeneration abgebaut werden. Degenerative Prozesse im Sinne einer Fibrosierung der Autotransplantate und die intraneurale Narbenbildung hemmen die Nervenregeneration und tragen zum ungerichteten Nervenwachstum bei (nach Den Dunnen et al., 1996).

2.5.2 Artefizielle Nervenleitschienen:

Das Prinzip artefizieller Leitschienen bei der Nervenrekonstruktion besteht darin, einen vorhandenen umschriebenen Nervendefekt durch künstliche Schienung des Nervens zu überbrücken. Dabei werden proximaler und distaler Nervenstumpf in ein Röhrenchensystem eingebracht, welches leer oder mit bestimmten Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren, SC oder Nährlösungen angereichert werden kann.

Die Nervenenden werden je nach Methode umwickelt bzw. mit einem Faden am Röhrenchensystem fixiert. Das am häufigsten bei der artefiziellen Schienung verwendete

Material stellen Silikonröhrchen dar. Sie sind nicht resorbierbar. Es gibt aber weiterhin eine Fülle an anderen Materialien, welche z.T. auch vom Körper resorbiert werden können. Die verwendeten Materialien reichen von Naturstoffen, wie Kollagen- und Gummiröhrchen bis hin zu Kunststoffen z.B. Polyethylen und Polyvinylchlorid. Bei der Auswahl sollte berücksichtigt werden, dass die Leitschiene in vivo gut verträglich ist und so wenig wie möglich pathologischen Reaktion wie Fibrosen, Verwachsungen oder Ödeme auslöst. Der Durchmesser sollte großzügig gewählt werden und ungefähr das 2-3 fache des ursprünglichen Nerven betragen um die Regeneration nicht durch Nervenquetschungen einzuschränken (Ducker TB, 1968).

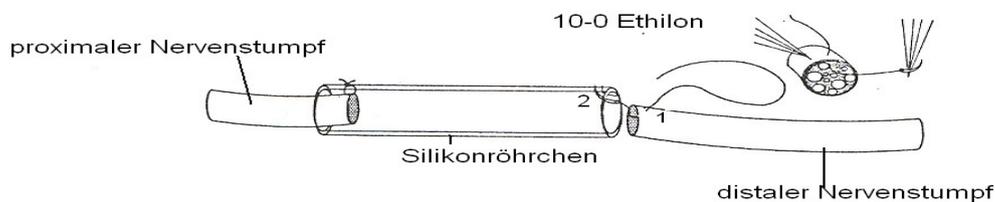


Abb. 13 Versuch der Nervenrekonstruktion mit Hilfe eines Silikonröhrchens. Der proximale und distale Nervenstumpf werden mit einer Einzelknopf-Naht (Ethilon 10-0) im Silikonröhrchen nach exakter Platzierung fixiert.

Artefizielle Nervenleitschienen erübrigen den mit Autotransplantaten verbundenen chirurgischen Zweiteingriff mit eventuell auftretenden neurologischen Ausfällen und beugen einem Mismatch vor. Länge und Durchmesser künstlicher Leitschienen können beliebig gewählt und exakt an den Defekt adaptiert werden, so dass der Nerv weder komprimiert, noch Zugkräften ausgesetzt wird. Die das Lumen anfangs ausfüllende Fibrinmatrix besteht aus einer im Vergleich zu Nerventransplantaten lockeren Struktur, durch welche die Axone leichter wachsen können. Die Röhrenform verhindert das Aussprießen von Fasern und dadurch das ungerichtete Faserwachstum. Die Nervenenden können mit nur jeweils einer Naht in der Schiene versenkt und fixiert werden. Dies vereinfacht nicht nur die Adaptation, sondern reduziert auch die intraneurale Narbenbildung. Leitschienen aus Silikon sind die am häufigsten experimentell verwendeten Interponate. Da Siliconschienen nicht permeabel sind, werden neurotrophe Substanzen, die an den Nervenendigungen gebildet werden bzw.

artefiziell eingebracht wurden, im Lumen konzentriert. Diese Vorteile erklären möglicherweise die guten klinischen Ergebnisse, die bereits mit Silikonschienen bei der Rekonstruktion 5 mm langer Defekte des N. medianus und N. ulnaris erzielt wurden (Lundborg G, 2004). Bei diesen Ergebnissen ist allerdings die relativ kurze Defektstrecke zu beachten. Gilt es längere Defektstrecken zu rekonstruieren, ist die Einsatzmöglichkeit von Silikonschienen beschränkt (Dahlin LB, 2001). Die fehlende Permeabilität hemmt zwar den Efflux neurotropher Faktoren, sie verhindert aber auch den Influx regenerationsfördernder Substanzen. Dies scheint bei längeren Strecken von Vorteil und Notwendigkeit zu sein. Das starre Material erlaubt zudem nur ein Wachstum des Nervens im Rahmen des vorgegebenen Durchmessers der Prothese. Auch birgt das rigide Material nicht nur die Gefahr von Brüchen, sondern ruft unter Umständen eine chronische Fremdkörperreaktion hervor, die ebenfalls zu einer Nervenkompression führen kann. Die Verwendung von Silikonschienen ist zwar für experimentelle Zwecke ideal, insbesondere für die Beschichtung mit wachstumsfördernden Zellen oder Faktoren; für die Verwendung beim Menschen sind aber aus genannten Gründen resorbierbare Materialien, z.B. Kollagen, vorzuziehen.

2.5.3 Bioartefizielle Nervenleitschienen

Vor der Interposition der Schienen können mit Methoden des Tissue Engineerings wachstumsfördernde Zellen oder Faktoren in das Innere der Leitschienen eingebracht werden (Schmidt CE, 2003). Durch derartige Modifikation der Leitschienen kann das Nervenwachstum beschleunigt, und es können längerstreckige Nervendefekte überbrückt werden. Es gibt multiple Strategien, über bioartefizielle Nervenleitschienen das Nervenwachstum zu verbessern. Zu den essentiellen Komponenten gehören 1) eine regenerationsfördernde Matrix, die mechanisch und biologisch das axonale Wachstum unterstützt, 2) wachstumsfördernde Zellen, die neurotrophische Faktoren produzieren und 3) spezifische Wachstumsfaktoren (siehe 2.3.2), die entweder von den transplantierten Zellen produziert, oder kontinuierlich freigesetzt werden. Die Matrix sollte biokompatibel und biodegradierbar sein. Die Beschichtung mit wachstumsfördernden Zellsubstraten wie Kollagen oder Laminin und präformierte longitudinale Kanäle fördern die Nervenregeneration. SC unterstützen mechanisch und parakrin das Nervenwachstum. Eine weitere Alternative stellen pluripotente Stammzellen dar. Die Zellen können genetisch verändert werden, so dass sie spezifische Wachstumsfaktoren überproduzieren, die zusätzlich das Nervenwachstum

fördern. So wurden bei dieser Arbeit auch SC praeoperativ in die Silikonröhrchen eingebracht, die den Wachstumsfaktor GDNF überexprimieren.

Da SC entscheidende Bedeutung bei der axonalen Regeneration nach peripheren Nervenläsionen zukommt, stellt ihre Transplantation in artefizielle Conduits eine erfolgversprechende Strategie dar. SC sezernieren neurotrophe Faktoren und bilden Büngner-Bänder, welche als Leitschiene für die vorgewachsenen Axonsprouts dienen. Durch die so erreichte Unterstützung der Regeneration spielen sie eine besondere Rolle bei längeren Defektstrecken. Durch Transplantation von SC können im Vergleich mit azellulären Matrices signifikant bessere Ergebnisse erzielt werden (Rodriguez FJ, 2000). Der Erfolg korreliert mit der Anzahl der implantierten Zellen. SC können unter anderem aus Biopsien peripherer Nerven gewonnen und angereichert werden (Weidner, 1999).

2.6 Real Time RT-PCR

Die Real time quantitative PCR (*RTQ-PCR*, auch Real Time Detection PCR, kurz RTD-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name "Real Time") durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden (z.B. Kompetitive PCR). Die Real Time PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Zum PCR-Ansatz wird neben den spezifischen Primern auch eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben. Die Sonde ist am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert. Wenn die intakte Sonde durch Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, so wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt (Fluoreszenz-Energietransfer, FRET).



Abb.14 Markierte Hybridisierungssonde.

Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde (siehe Abb. 14) durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und der Reporterfarbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren (siehe Abb. 15). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht.

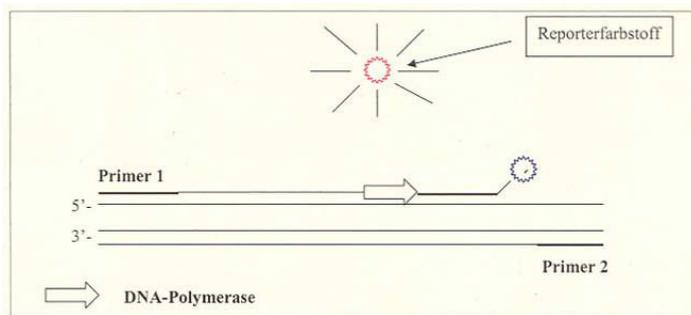


Abb.15 Reporterfarbstoff emittiert Fluoreszenzlicht.

Eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität kann nur dann erfolgen, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional.

Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten CT-Wert ("threshold cycle") (siehe Abb.16). Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird. Ein großer Vorteil der Real Time PCR-Technologie ist die verringerte Kontaminationsgefahr, das PCR-Amplifikat muss nicht mehr auf ein Agarosegel aufgetragen werden (Vermeidung von "carry-over") und die Integration der Bestätigungsreaktion im PCR-Lauf (fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden).

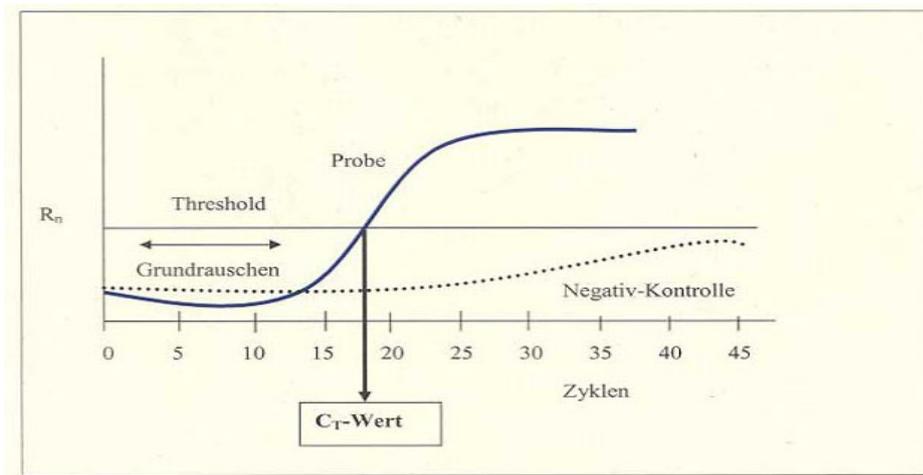


Abb.16 Ermittlung des CT-Wertes bei RT-PCR.

Für die Real Time Polymerasekettenreaktion wird oft die Abkürzung RT-PCR verwendet, was problematischerweise zu Verwechslungen führen kann, da auch die Reverse Transkriptase PCR so abgekürzt wird. Bei unserer Arbeit wurde von Herrn Dr. Dieter Saur die Methode der quantitativen Real Time Reverse Transkriptase PCR benutzt, um die mRNA der NOS zu quantifizieren.

Verschiedene Rechenmodelle werden für die Quantifizierung herangezogen, wobei meistens ein Referenz-Gen (z.B. GAPDH: globaler Gewebsmarker; PGP9.5: neuronaler Marker) mitgemessen wird, um einen relativen Menge-Vergleich durchzuführen (relative Quantifizierung). Eine interne Kontrolle kann ein Gen-Transkript sein, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dieses wird als Normalisierung bezeichnet. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal basiert, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments. Eine absolute Quantifizierung ist aufwendig und die Ergebnisse fragwürdig, daher wird diese Art der Quantifizierung selten durchgeführt

2.6.1 Normalisierung

PGP 9.5

Protein gene product 9.5 (PGP 9.5), auch bekannt als „ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-1“ (UCH-L1), ist ein 27-kDa Protein, welches erstmals aus Vollhirnpräparaten isoliert wurde. PGP9.5 wird der Familie der Ubiquitin Hydrolase Familie zugeordnet. Die Funktion des Proteins ist bisher unklar. Die Expression von PGP9.5 findet sich vorallem in nervalem

Gewebe, wie Neuronen und neuroendokrinen Zellen. PGP 9.5 kommt daher eine bedeutende Rolle als Marker für neuronales Gewebe zu und wird zunehmend bei quantitativen Genanalysen verwandt. In zahlreichen durchgeführten Studien erfolgte eine Normalisierung neuronaler Genexpression des zentralen und peripheren Nervensystems gegen diesen Marker. Für die vorliegende Arbeit wird die Rolle PGP 9.5 als neuronaler Marker bei der quantitativen mRNA Analyse der NOS-Isomerasen verwandt. Die Expression der einzelnen NOS-Isomerasen kann somit im Bezug zum neuronalen Gewebe gesetzt werden (Quotient: xNOS/PGP 9.5). nNOS z.B. wird nur im nervalem Gewebe exprimiert. Eine Normalisierung gegen einen spezifischen Marker für neuronales Gewebe umgeht daher eine Verfälschung der Expressionsrate durch Atrophie bzw. Hypertrophie des Gesamtgewebes (Saur D, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt eine Normalisierung der iNOS, nNOS und eNOS gegen PGP 9.5; der Anteil der Expression der entsprechenden NOS-Isomerase im Verhältnis zum vorhandenen Nervengewebe wird somit dargestellt.

GAPDH

Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH, G3PDH oder GPDH) ist eines der Schlüsselenzyme der Glykolyse. Es katalysiert die reversible oxidative Phosphorylierung von Glyceraldehyd-3-phosphat. Das GAPDH-Gen wird in hohem Level ubiquitär in fast allen Geweben oder Zellen exprimiert. Daher kommt ihm die Bedeutung eines „housekeeping“ Gens zu. Housekeeping Proteine wie GAPDH werden unter anderem als Kontrollen bei Western Blot und Proteinnormalisierung verwendet. In der vorliegenden Arbeit erfolgt eine Normalisierung der NOS-Isomerasen gegen GAPDH (Quotient: xNOS/GAPDH). Im Gegensatz zur oben beschriebenen Normalisierung gegen PGP 9.5, welches neuronales Gewebe markiert, erfolgt bei der Normalisierung gegen GAPD eine Normalisierung gegen das Gesamtgewebe. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt eine Normalisierung der iNOS, nNOS und eNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“; die Expression der entsprechenden Isomerase im Verhältnis zum Gesamtgewebe wird somit dargestellt. Beeinflussung durch Hypertrophie bzw. Atrophie des Gesamtgewebes können dabei das Ergebnis entscheidend beeinflussen. So führt z.B. eine Atrophie des Gewebes ohne Veränderung der Expression der NOS-Isomerase zu einer scheinbaren Expressionserhöhung durch Erniedrigung des Quotientennenners.

3. Experimentelle Untersuchungen

3.1. Zielsetzung

Bei der vorliegenden Studie werden alternative Methoden der Nervenrekonstruktion bei Verletzung der peripheren erektilen Nerven im Vergleich zueinander gezeigt. Hierzu erfolgen Versuche an der Ratte, welche auf Grund ihrer anatomischen Ähnlichkeit ein hervorragendes Vergleichsmodell zum Menschen darstellt.

Auf der einen Seite erfolgt die herkömmliche Methode der Nerventransplantation, bei der mit Teilen des Nervus genitofemoralis ein Nervendefekt des kavernösen Nervens überbrückt werden soll. Auf der anderen Seite wird mit Hilfe artefizieller Leitschienen versucht, das Wachstum des organären Nervens positiv zu beeinflussen und damit die Nervenkontinuität wiederherzustellen. Hierbei wird weiterhin nach verschiedenen Wachstumsfaktoren unterschieden, die den artefiziellen Leitschienen zugesetzt werden. Zusätzlich werden mehrere Kontrollgruppen zur Sicherung der Validität der Studie verwendet.

Bei den Gruppen erfolgen optische, funktionelle und histologische Auswertungen; des Weiteren werden bei einigen der untersuchten Tiere Teile des Corpus cavernosum freipräpariert, entnommen und mit Hilfe einer quantitativen Real-time Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion die relative NOS-Konzentration gegenüber spezifischen Gewebemarkern untersucht. Der NOS, welche NO synthetisiert, kommt bei der Erektion eine bedeutende Rolle zu. Hierbei soll weiterhin eine Differenzierung in die verschiedenen NOS-Typen erfolgen und deren Konzentrationsänderungen mit der jeweiligen Rekonstruktionsform in Beziehung gesetzt werden.

Zusammenfassend soll also untersucht werden, wie verschiedene rekonstruktive Maßnahmen, beziehungsweise wie sich das Vorhandensein von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf das mikroskopische Bild des Nervens, auf die erektile Funktionalität und auf molekularer Ebene auf das Vorhandensein der NOS auswirkt und damit ermittelt werden, welche von größtem Vorteil ist und sich Mediatoren verhalten, welche weitere Therapieoptionen ermöglichen können.

Diese Untersuchungen sollen bei Männern, die Nervendefekte erektiler Nervenfasern aufweisen, wie zum Beispiel nach radikaler Prostatovesikulektomie, die beste Möglichkeit einer Rekonstruktion ermitteln.

3.2. Material und Methode

3.2.1 Material

3.2.1.1 Versuchstiere

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tiergesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Für die Versuche werden männliche, unkastrierte Ratten vom Stamm Fischer 344 (Firma Charles River in Sulzfeld/ Deutschland) verwendet. Die Tiere sind zu Versuchsbeginn etwa 16 Wochen alt und zwischen 240 und 280 g schwer.

Die Ratten vom Stamm Fischer 344 sind für diesen Versuch ausgewählt worden, da die verwendeten SC aus Nervenextrakten von Ratten des gleichen Inzuchtstammes gewonnen werden und somit die Gefahr einer Abstoßungsreaktion gering ist.

Haltungsbedingungen

Alle institutionellen und nationalen Richtlinien für Tiersicherheit und Komfort wurden streng beachtet.

Die Ratten wurden in Gruppen zu je 4 bis 5 Tieren in Standard Makrolon®-Käfigen Typ IV gehalten. Weichholzfaser, Zellstoff und Heu dienten als Bodenbelag. Die Tiere erhielten Pellets (Altromin 1324, Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, Firma Altromin International, Laage) zur ad libitum-Fütterung. Wasser wurde ad libitum über Trinkflaschen, die täglich gewechselt wurden, angeboten. Die Käfige wurden mindestens zweimal in der Woche, postoperativ häufiger gereinigt bzw. ausgetauscht. Die Haltung der Ratten erfolgte in einem speziellen Tierstall mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 bis 65% und einer konstanten Raumtemperatur von 21 bis 23°C.

Ein Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine automatische Beleuchtungsdauer von 12 Stunden erreicht.

3.2.1.2. Verwendetes Material

Silikonröhrchen:

Die Silikonröhrchen werden als Silikonschlauch von der Firma Aromando Medizintechnik GmbH, Düsseldorf bezogen. Der Innendurchmesser beträgt 0,51 mm, der Außendurchmesser 0,94 mm. Für die Silikonröhrchen wird der Schlauch auf eine Länge von ca. 0,5 cm zugeschnitten. Die Röhrchen werden einzeln in Alufolie verpackt und bei 121°C für 20 min autoklaviert (Tuttnauer Autoclave-Steam-Sterilizer).

Präparation der Silikonröhrchen mit SC:

SC wurden mit Trypsin/EDTA (Biochrom) zur Dissoziation gebracht und in einer Konzentration von 25000 Zellen/ μ l in die Silikonröhrchen eingebracht. Die Zellsuspension wurde dabei in die Spitze einer Eppendorfpipette aufgezogen. Durch die Kapillarkraft wurden die Röhrchen anschließend vollständig mit der Zellsuspension gefüllt (1 μ l). Anschließend wurden die Röhrchen über 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (Schwann-Zell-Kulturmedium) inkubiert. Vor der Implantation in vivo wurden die Röhrchen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen.

Nahtmaterial:

Für die Nerven transplantation und zur Fixierung der Silikonröhrchen werden 10-0 Ethilon-Fäden (Ethilon, Norderstedt) verwendet. Für Haut- und Muskelnaht werden jeweils resorbierbare 4-0 Monocryl-Fäden (Ethilon, Norderstedt) verwendet.

Verwendete Geräte:

Elektrostimulationsgerät:	Hameg HM 8131-2 (Frankfurt)
Druckmessgerät:	Andromeda Ellipse 4 (Taufkirchen)
Operatiomikroskop:	Zeiss OPMI 1-F (Zeiss, Jena) Zeiss OPM 1-9 (Zeiss, Jena)
Perfusionspumpe:	Regio Analog, Modell ISM 830 (Wertheim-Mondfeld)

RNAlater Lösung:

(Ambion, Austin, TX)

Perfusionsflüssigkeit:

Material: 4% PFA Lösung (1l Endvolumen)

Arbeitsschritte:

500 ml Wasser werden auf 65°C erhitzt, dann 40g Paraformaldehyd (Prills Aldrich #441244) und 1ml 10M NaOH unter ständigem Rühren hinzugefügt, bis das Paraformaldehyd sich vollständig aufgelöst hat. Danach wird der abgekühlten Lösung 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer hinzugeben und gefiltert (Schleicher&Schuell 597 ½ Faltenfilter; diameter 320 mm). Vor Gebrauch wird die Lösung mit Eis auf ungefähr 4°C gekühlt und der pH-Wert überprüft. Der pH-Wert wird, wenn nötig, auf pH 7,4 korrigiert.

Perfusionspumpe:

Regio Analog (Modell ISM 830)

Smatec Laboratoriumstechnik GmbH, Futterestr.16 , 97877 Wertheim-Mondfeld

MMF-Kombinationsnarkose:

Midazolam (Dormicum®, Roche Grenzach-Wyhlen)	2 mg/kg KGW
+ Medetomidin (Dormitor®, Pfizer Karlsruhe)	0,15 mg/kg KGW
+ Fentanyl 25 (Fentanyl®, Curamed Nürnberg)	0,005 mg/kg KGW

Die Anästhetika werden in einer Mischspritze aufgezo-gen und den Ratten intramuskulär in die HintergliedmaÙe injiziert.

Zur Antagonisierung der Narkose nach Beendigung der Operation dient eine Kombination aus Atipamezol, Flumazenil und Naloxon (AFN):

Atipamazol (Antisedan®, Pfizer Karlsruhe)	0,75 mg/kg KGW
+ Flumazenil (Anexate®, Roche Grenzach-Wyhlen)	0,200 mg/kg KGW
+ Naloxon (Narcanti®, Curasan, über Pharmaselect Ladenburg)	0,120 mg/kg KGW

Die Antagonisten werden in einer Mischspritze aufgezo-gen und subkutan injiziert.

3.2.2. Methode

3.2.2.1 Versuchsplan

Gruppen:

Gruppenname	Operationstechnik
SC + GDNF	Bilaterale Exzision eines 5mm langen Segmentes der kavernösen Nerven, danach Implantation eines mit GDNF überexprimierenden SC gefüllten Silikonröhrchens
Trans	Nerventransplantation der Nervi genitofemorales in die nach bilateraler 5mm Exzision entstandene Lücke der kavernösen Nerven
Sham	Kontrollgruppe mit alleiniger Laparatomie und Präparation der Nn. erigentes bds.
Nervex	Kontrollgruppe mit Nervenexzision eines 5mm langen Nn. erigentes Stück bds. ohne Rekonstruktion
SC	Bilaterale Exzision eines 5 mm Segments der kavernösen Nerven, danach Implantation eines mit SC gefüllten Silikonröhrchens

Tab.2 Tiergruppen mit Gruppenname und durchgeführter Operationstechnik.

	Anzahl Gruppentiere	Anzahl NOS-Quantifizierung
SC + GDNF	n=7	4
Trans	n=7	4
Sham	n=10	4 (2 auswertbar)
Nervex	n=12	4 (3 auswertbar)
SC	n=7	4

Tab.3 Gruppenname mit n= Anzahl der Guppentiere, Anzahl der NOS Quantifizierung.

3.2.2.2 Anästhesie

Die Narkose wurde mit Isofluran eingeleitet und mit einer Kombination aus Fentanyl 25 (0,005 mg/kg KG, Fentanyl®, Curamed), Midazolam (2 mg/kg KG, Dormicum®, Roche) und Medetomidin (0,15 mg/kg KG, Dormitor®, Pfizer) fortgesetzt. Die Anästhetika wurden in einer Mischspritze aufgezogen und den Ratten intramuskulär in die Hintergliedmaße injiziert. Zur Antagonisierung der Narkose nach Beendigung der Operation diente eine Kombination aus Flumazenil (0,2 mg/kg KG, Anexate®, Roche), Naloxon (0,12 mg/kg KG, Narcanti®, Curasan) und Atipamezol (0,75 mg/kg KG, Antisedan®, Pfizer). Diese Anästhetika wurden in einer Mischspritze aufgezogen und subkutan appliziert.

3.2.2.3 Operationstechnik

3.2.2.3.1 Gruppenunspezifische Operationstechnik

Die narkotisierten Ratten werden mit Klebestreifen mit abgespreizten Gliedmaßen auf einer Operationsunterlage in Rückenlage fixiert. Eine Wärmematte schützt vor Auskühlung. Das Operationsfeld wird rasiert und mit alkoholischer Sprühdesinfektion behandelt.

Zum Schutz der Hornhaut wird diese mit Dexpanthenol-haltiger Augensalbe (Bepanthen®-Augen- und Nasensalbe, Roche Grenzach-Wyhlen) bedeckt. Ein ca. 4 cm langer Hautschnitt wird von der Symphysis pubis bis zur Mitte des Abdomens mit einem Skalpell Größe 11 durchgeführt. Die Bauchdecke wird in der Linea alba eröffnet und das Operationsgebiet unter Zuhilfenahme von vier Haltehaken offen gehalten. Die Hoden werden aus dem Hodensack durch das Cavum vaginale intraabdominal verlagert, das Gubernaculum testis gelöst und die Hoden aus der Bauchhöhle vorgelagert. Vorfallendes Darmgewebe wird zusammen mit der Samenblasendrüse in das vordere Abdomen verlagert. Die Harnblase wird, sollte sie stark gefüllt sein, manuell ausmassiert, um eine bessere Übersicht über das Operationsfeld zu haben. Die rechte und linke Prostataseite werden jeweils aufgesucht, das aufgelagerte und umgebende abdominelle Fettgewebe stumpf durchtrennt und verlagert. Das Ganglion und die kavernösen Nerven werden unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops proximal auf der Prostata dargestellt. Die kavernösen Nerven sind deutlich in ihrem Verlauf nach kaudal, bedeckt von einer Faszie, zu erkennen und stellen sich bei genauerer Betrachtung nicht als kompakter und einheitlicher Nerv, sondern als eine Ansammlung mehrerer dünner Nervenfasern dar, die ebenfalls aus dem Ganglion entspringen und nach kaudal ziehen. Zentral aus dem Ganglion abgehend, lässt sich ein Hauptstrang identifizieren, der sich teilweise in der Mitte der Prostata nochmals in zwei Äste teilt. Die über die Nerven verlaufende Faszie wird vorsichtig durchtrennt und die Nerven mit einer 27 Gauge-Kanüle unterminiert. Die Nervenfasern werden in ihrem gesamten Verlauf auf der Prostata gelöst ohne die Prostatakapsel zu verletzen. Quer über die Nervenfasern verlaufende Blutgefäße werden geschont. Die Nerven werden für die Transplantation und die Implantation der Silikonröhrchen mobilisiert und unter den Blutgefäßen hervorgezogen.

Für die Versuche wird jeweils nur der dickste Hauptstrang der kavernösen Nerven herangezogen. Die sichtbaren dünnen und parallel verlaufenden Nebenstränge werden durchtrennt. Dasselbe geschieht auf der kontralateralen Seite.

Nach Beendigung der jeweiligen Operation werden die Hoden in die Bauchhöhle zurückverlagert. Die Rückverlagerung in den Hodensack ist nicht nötig. Zur antibiotischen Abdeckung eignet sich eine intraperitoneale Lavage mit 0,1 ml Baytril® 2,5% (Enrofloxacin, Bayer Leverkusen), verdünnt mit 2 ml NaCl.

Die Naht der Linea alba erfolgt fortlaufend mit resorbierbarem 4-0 Monocryl (Firma Ethilon®, Norderstedt). Die Hautnaht erfolgt ebenfalls fortlaufend mit resorbierbarem 4-0 Monocryl (Firma Ethilon®, Norderstedt) und wird durch weitere Einzelnähte gesichert. Zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes erhalten die Ratten eine subkutane Injektion von 20 ml Ringer®-Lösung. Die Ratten werden mit Ohrclips und laufender Nummer (Firma Hauptner, Solingen) individuell gekennzeichnet, des Weiteren werden sie mit permanenten Farbstiften am Schwanz markiert. Die Antagonisierung der Injektionsnarkose erfolgt mit Atipamezol, Flumazenil und Naloxon (AFN). Nach Antagonisierung der Narkose erwachen die Tiere in der Regel komplikationslos innerhalb von zwei bis drei Minuten. Die Nachbehandlung erfolgt bei allen Tieren gleich, unabhängig von der jeweiligen Operationstechnik oder Gruppenzugehörigkeit. Zur Schmerztherapie wird den Tieren, sobald nach Erwachen der Schluckreflex wieder einsetzt, 2 Tropfen Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-ratiopharm 1®, Ratiopharm Ulm) oral verabreicht. Als weitere Schmerztherapie wird Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma München) gegeben. Den Tieren wird über drei Tage alle 12 Stunden 0,03 mg = 0,1 ml Buprenorphin subkutan injiziert. Des Weiteren erhalten sie eine 5-tägige Antibiose mit 0,1 ml Baytril® 2,5% (Enrofloxacin, Bayer Leverkusen), verdünnt mit 0,5 ml NaCl einmal täglich und bei Bedarf mehrere ml NaCl –Lösung. Direkt nach dem Erwachen werden die Tiere für ca. 3 Stunden unter eine Rotlichtlampe gesetzt, um den Wärmeverlust auszugleichen. Danach werden die Tiere wieder in ihre ursprüngliche Käfiggruppe verbracht. Nach dem Erwachen steht den Tieren sofort wieder Futter und Wasser zur freien Verfügung. Bis zur Erfolgskontrolle verbleiben die Tiere ohne weitere Behandlungen in ihrer Käfiggruppe (Caspers C, 2004).

3.2.2.3.2. Operationsgruppen

Sham:

Bei dieser Gruppe, die als Kontrollgruppe benutzt werden soll, wird das Abdomen der Versuchstiere eröffnet, die kavernen Nerven aufgesucht und dargestellt. Es werden keine Nervendefekte an den Nervi erigentes provoziert, und es findet bei dieser Gruppe keine rekonstruktive Methode statt.

Nervex:

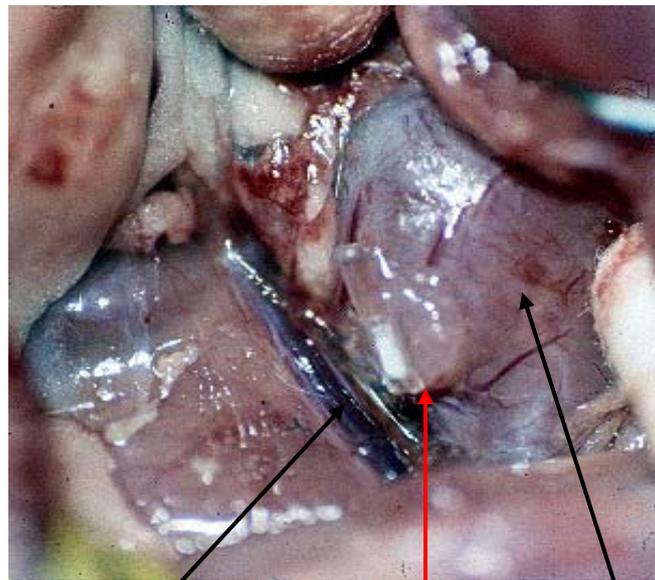
Diese Gruppe stellt eine weitere Kontrollgruppe dar. Bei Tieren der Nervex-Gruppe wird das Abdomen der Ratten eröffnet und die kavernen Nerven aufgesucht und freipräpariert.

Nach der Präparation werden bilateral Nervensegmente exzidiert. Es werden auf beiden Seiten unterhalb des pelvinen Plexus 5 mm lange Nervenstücke exzidiert und zusätzlich die oft zahlreichen parallelen Seitenstränge durchtrennt. Dadurch soll eine vollständige Unterbrechung der kavernen Nerveninnervation erfolgen. Nach Exzision bei dieser Gruppe erfolgt keine Rekonstruktion, das Abdomen wird wieder geschlossen und die Narkose ausgeleitet.

SC: Implantation von mit SC-beschichteten Silikonröhrchen

Dieser Gruppe wird auf beiden Seiten der Prostata ein mit SC beschichtetes Silikonröhrchen mit einer Länge von 0,5 cm implantiert, das als Leitschiene für die Nervenregeneration dienen soll. Die kavernen Nerven werden frei präpariert und auf ihrer gesamten Länge mobilisiert. Für die Implantation wird der zentrale Hauptstrang herangezogen. Es werden 0,5 cm des kavernen Nerven exzidiert. Der proximale wie der distale Nervenabschnitt werden mit nur jeweils einem Knoten an dem jeweiligen Ende des Silikonröhrchens befestigt. Das Epineurium des distalen Nervenstrang wird zuerst mit einem 10-0 Ethilon-Faden fixiert, da es sich nach der Durchtrennung des Nerven sehr schnell kontrahiert und später im distalen Anteil der Prostata schwer auffindbar ist. Der proximale Abschnitt dagegen ist durch seine Fixierung am Ganglion leicht zu erkennen. Um einen Knoten am Silikonröhrchen zu legen, belässt man ein möglichst langes Fadenende sowie den Faden mit Nadel am Nerv, wie es in Abb. 13 gezeigt wird. Das Röhrchen wird nahe dem Rand durchstoßen und das fixierte Nervenende vorsichtig am Faden in das Röhrchen gezogen. Das Nervenende wird an die Innenwand des Silikonröhrchens gezogen und mit dem verbliebenen Fadenende außerhalb des Röhrchens verknotet.

Der proximale Anteil des kavernösen Nervs wird ebenfalls mit einem 10-0 Ethilon-Faden fixiert, in das proximale Ende des Silikonröhrchens gezogen und dort befestigt. In Abb.17 ist ein Silikonröhrchen nach der Implantation zu sehen. Dabei ist darauf zu achten, die Nervenabschnitte möglichst spannungsfrei zu fixieren, da sich die Nervenschnitte nach ihrer Durchtrennung zusammenziehen und somit leicht ausreißen können. Derselbe Vorgang erfolgt auf der kontralateralen Seite. Des Weiteren erfolgt eine Durchtrennung sämtlicher Seitenäste der kavernösen Nerven.



V. iliaca interna Silikonröhrchen seitlicher Prostatallappen

Abb. 17 Silikonröhrchen nach der Implantation.

SC+GDNF: Silikonröhrchen mit GDNF- überexprimierenden SC

Diese Gruppe wird analog zur SC-Gruppe operiert (siehe oben), die Silikonröhrchen enthalten allerdings zusätzlich GDNF-überexprimierende SC (siehe 3.2.2.8, SC mit retroviralen Vektoren für GDNF).

TRANS: Transplantation des N. genitofemoralis

Bei dieser Gruppe erfolgt beidseitig die Transplantation eines Segments des ipsilateralen N. genitofemoralis auf den exzidierten Teilabschnitt des N. cavernosum als autologes Nerventransplantat. Dieser Nerv entspricht in seinen Größenverhältnissen in etwa der Größe kavernöser Nerven. Der Verlust des N. genitofemoralis führt nur zu einem geringen Sensibilitätsverlust der Haut und hat keine größeren motorischen Ausfälle zur Folge.

Der N. genitofemoralis verläuft parallel zur V. iliaca interna (siehe Abb.18). Das Freipräparieren und Lösen des Nervens auf dessen gesamten Verlauf vom umgebenden Bindegewebe erfolgt mit einer 27 Gauge Kanüle und Pinzette. Hierbei muss besonders darauf geachtet werden die V. iliaca interna nicht zu berühren, da es sehr schnell zu einer Verletzung der Gefäßwand und somit zu heftigsten Blutungen kommen kann. Der N. genitofemoralis wird möglichst weit in seinem distalen Verlauf mit einem 10-0 Ethilon-Faden und einem Knoten, der durch das Epineurium gelegt wird, fixiert. Distal des Knotens wird der N. genitofemoralis durchtrennt und zum N. cavernosus geführt (siehe Abb. 19 A).

Der mit einem Knoten fixierte Anteil des N. genitofemoralis wird am distalen Ende des kavernen Nervens mit einem 10-0 Ethilon-Faden am Epineurium fixiert. Dann erfolgt eine Durchtrennung des N. genitofemoralis ca. 0,8 cm proximal der Anastomose.

Das proximale Ende des 0,8 cm langen Transplantats wird ebenfalls mit einem 10-0 Ethilon-Faden fixiert und an das proximale Ende des N. cavernosus in einer End-zu-End-Anastomose, wie in Abb. 19b gezeigt, transplantiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Fixierung nicht zu nahe am Ganglion geschieht. Das Transplantat sollte etwas länger als der exzidierte Nervenabschnitt sein, damit gewährleistet wird, dass eine spannungsfreie Adaptation erfolgt, da sich die Nerven und vor allem das Transplantat nach ihrer Durchtrennung zusammenziehen.

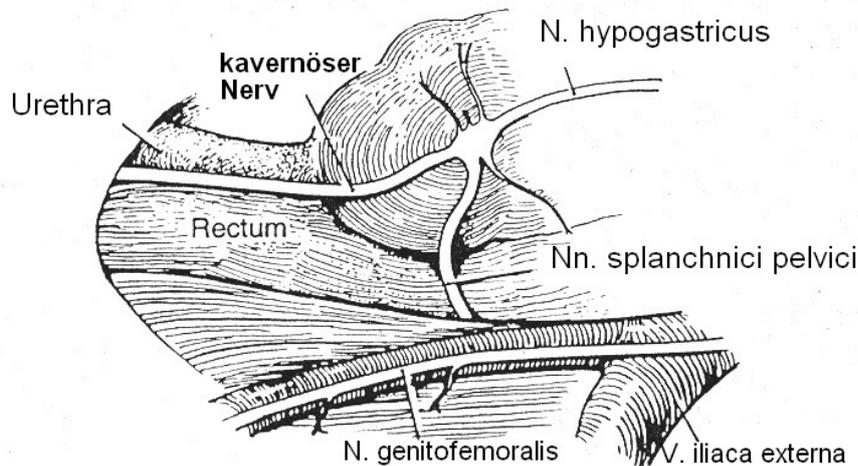


Abb. 18 Schematische Darstellung der neuroanatomischen Verhältnisse im Becken der Ratte. Die Zeichnung zeigt zentral das Ganglion pelvinum auf der dorsolateralen Seite der Prostata. Der kavernöse Nerv zieht entlang der Urethra nach kaudal. Das Ganglion wird durch die Nn. splanchnici pelvici und den N. hypogastricus innerviert. Der N. genitofemoralis verläuft parallel zur V. iliaca interna (modifiziert nach Ball RA, 1992).

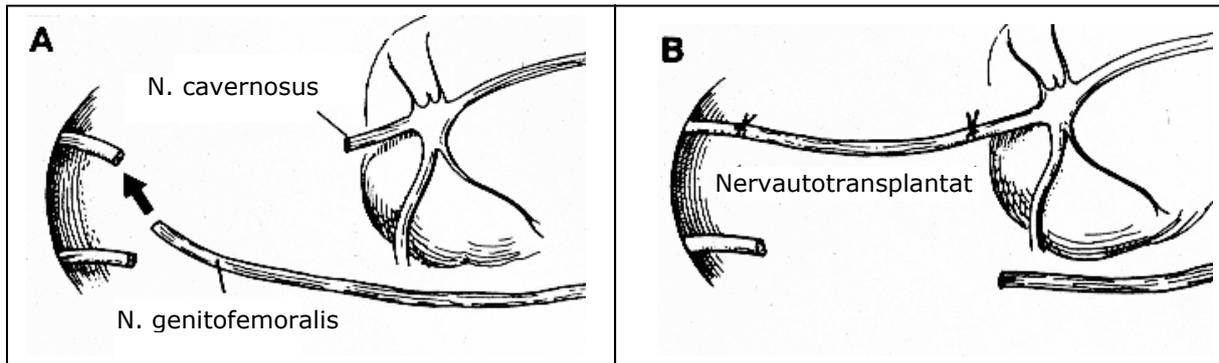


Abb. 19 Autologe Transplantation des N. genitofemoralis. **A:** Nach Exzision des Nervus cavernosus wird das distale Ende des Nervus genitofemoralis an den distalen kavernösen Nervenstumpf herangeführt und epineural anastomosiert. **B:** Nach proximaler Durchtrennung des Nervus genitofemoralis erfolgt die epineurale Anastomose mit dem proximalen kavernösen Nervenstumpf (Ball et al., 1992).

3.2.2.4 Elektrostimulation

Die Tiere der Versuchsgruppen werden ca. 7 Wochen nach der durchgeführten Operation erneut mit der MMF-Kombinationsnarkose (Midazolam, Medetomidin und Fentanyl) betäubt. Die Tiere werden in Rückenlage fixiert und auf eine Wärmematte gelegt, abdominal rasiert und zusätzlich am Schwanzansatz und im perianalen Bereich inklusive der Hodensäcke großzügig rasiert.

Es erfolgt, wie bereits in der ersten Operation beschrieben, eine erneute Laparotomie und Freilegung der Prostata. Der behandelte Bereich wird aufgesucht, überlagerndes Fettgewebe und eventuelle Verwachsungen vorsichtig stumpf gelöst und auf Nervenwachstum hin untersucht. Die regenerierten und neu gebildeten Nerven, das Ganglion pelvinum, das Transplantat sowie das Silikonröhrchen müssen großzügig von Verwachsungen befreit werden, um ein Fehlableiten bei der Elektrostimulation zu vermeiden. Besonders Verwachsungen der Muskulatur der seitlichen Bauchwand mit der Prostata und dem Silikonröhrchen führen zu deutlichen Fehlableitungen. Für die Elektrostimulation wird der Penis aus dem Präputium vorverlagert. Eine spezielle Zirkumzidierung des Penis ist nicht nötig. Es erfolgt die Platzierung der bipolaren Stimulationselektrode, die an einen Pulsgenerator angeschlossen ist, distal des Ganglions bzw. möglichst nahe des Transplantats oder dem Silikonröhrchen. Die Elektrostimulation wird mit 6 V, 20 Hz und 1,5 msec durchgeführt. Die Stimulation wird auf jeder Seite durchgeführt und die Erektion mit einer reinen Ja-Nein-Antwort für beide Seiten getrennt beurteilt.

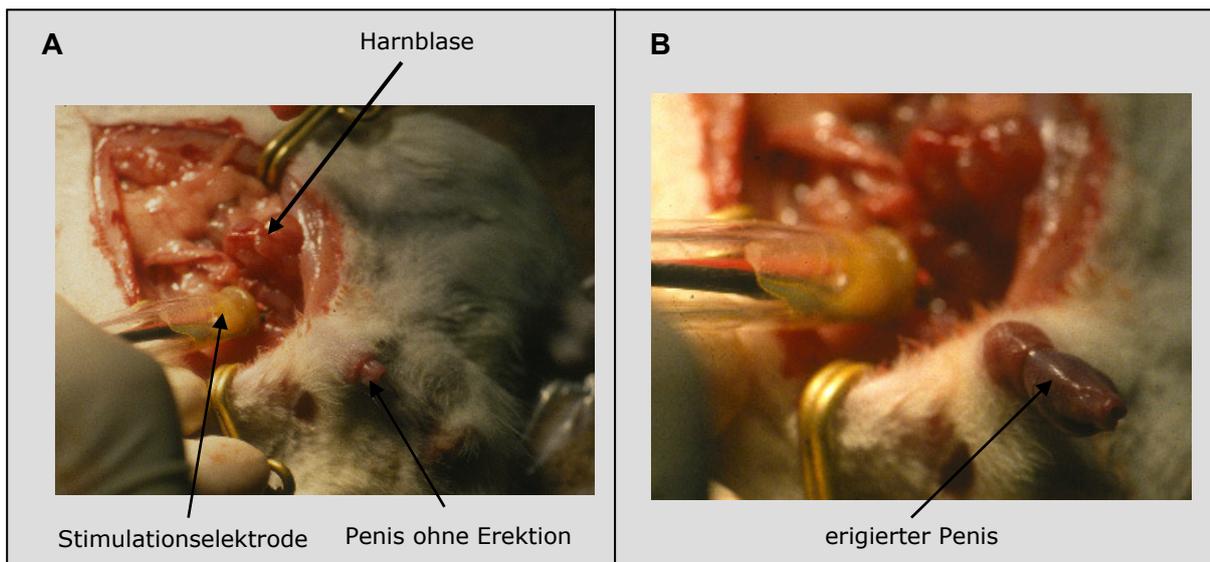


Abb.20 Elektrische Neurostimulation der kavernösen Nerven intraoperativ. **A:** Mit Hilfe der Stimulationselektrode wird das pelvine Ganglion aufgesucht und der erektile Nerv stimuliert. **B:** Unter Stimulation kann eine optisch positive Erektion beobachtet werden.

Zur Überwachung des Blutdrucks wird ein Katheter in der Schwanzarterie platziert und der mittlere arterielle Blutdruck aufgezeichnet. Dazu wird die Schwanzhaut durchtrennt, das Bindegewebe gelöst und der Sehnenstrang vorsichtig inzidiert. Die darunter liegende Arterie wird mit einer gebogenen Pinzette mobilisiert und vorverlagert. Mit einer 24 Gauge-Kanüle wird die Arterienwand durchstoßen, leicht angehoben und der Katheter eingeführt.

Der kavernöse Druck wird über einen Katheter gemessen, der in das linke Corpus cavernosum eingeführt wird. Als Katheter für die Druckmessung im Corpus cavernosum und im Schwanz dienen jeweils ein Silikonschlauch (Firma Karmann und Droll, München) mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm und einem Außendurchmesser von 0,8 mm, die über eine 25 Gauge-Kanüle und einen Verbindungsschlauch beide mit dem Druckmessgerät (Andromeda Ellipse 4, Taufkirchen) verbunden sind. Beide Katheter sind mit heparinierter Ringer-Lösung gefüllt. Um den Katheter ins Corpus cavernosum zu legen, wird ein 2 cm langer transversaler, perianaler Hautschnitt gezogen, der M. ischiocavernosus quer in seinem Verlauf durchtrennt und das Fett- und Bindegewebe gelöst. Das Crus zeigt sich als eine weißlich glänzende Bindegewebsplatte zwischen den Muskelbäuchen des M. ischiocavernosus und des M. bulbocavernosus und lässt sich stumpf lösen. Mit einer 24 Gauge-Nadel wird in die Bindegewebsplatte des Crus penis inzidiert und der Katheter locker platziert (siehe Abb. 21). Der richtige Sitz des Katheters zeigt sich durch das Einströmen von Blut in den Schlauch, das durch den vorhandenen kavernösen Basisdruck in den Schlauch gepresst wird.

Die Elektrostimulation wird auf beiden Seiten der Prostata getrennt durchgeführt. Der Druckanstieg wird jeweils im linken Corpus cavernosum gemessen und in einer Verlaufskurve für die jeweilige stimulierte Seite getrennt aufgezeichnet (siehe Abb. 23). Zur Aufzeichnung der intrakavernösen Druckverläufe wird das Druckmessgerät „Andromeda Ellipse 4“ siehe Abb. 22 benutzt, welches eine Aufzeichnung auf Thermopapier ermöglicht.

Es erfolgt eine Messung des kavernösen Drucks im Ruhezustand ohne Stimulation, der sogenannte Basiswert. Außerdem wird der Anstieg des kavernösen Drucks nach Elektrostimulation bis zum Erreichen des Maximalwertes (Plateau) aufgezeichnet. Zusätzlich wird die Dauer bis zum Druckanstieg in Sekunden nach Stimulationsbeginn, sowie bis zum Erreichen des Maximalwertes ausgewertet.

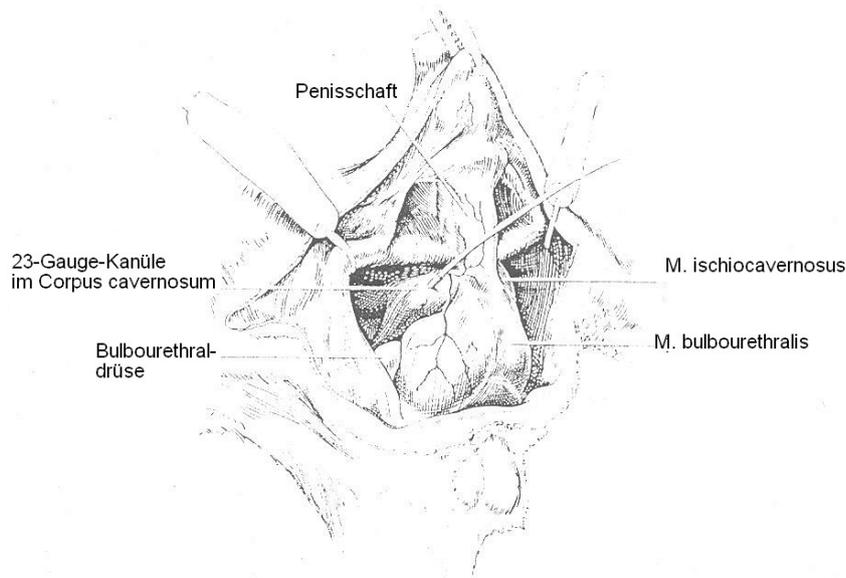


Abb. 21 Druckmessung im Corpus cavernosum nach Einbringen eines Katheters ins Corpus cavernosum.

3.2.2.5 Intrakavernöse Druckmessung

Der intrakavernöse Basisdruck stellt den Ruhedruck dar, der im Schwellkörper vor einer Stimulation vorliegt. Dieser ist der Ausgangswert für die Messung der Druckerhöhung. Es wird der Druckanstieg nach Elektrostimulation bis zum Erreichen des Maximalwertes bewertet. Außerdem wird die zeitliche Dauer ab Stimulationsbeginn bis zu einem Druckanstieg, sowie bis zum Erreichen des Maximalwertes gemessen. Der Druckanstieg wird jeweils nur im linken Schwellkörper über einen Katheter gemessen, die Stimulationen werden aber für jede Seite getrennt vorgenommen. Dadurch entsteht hier pro Ratte jeweils eine getrennte Auswertung für die rechte sowie die linke Seite.

Basisdruck:	$p(b)$ (in mmHg)
Maximalwert:	$p(max)$ (in mmHg)
Druckanstieg bis Maximalwert:	δp (in mmHg)
zeitliche Dauer bis Druckanstieg:	δt (in Sekunden)
zeitliche Dauer bis Erreichen des Maximalwertes:	$\delta t(max)$ (in Sekunden)



Abb. 22 Intrakavernöses Druckmessgerät (Andromeda Ellipse 4 (Taufkirchen)).

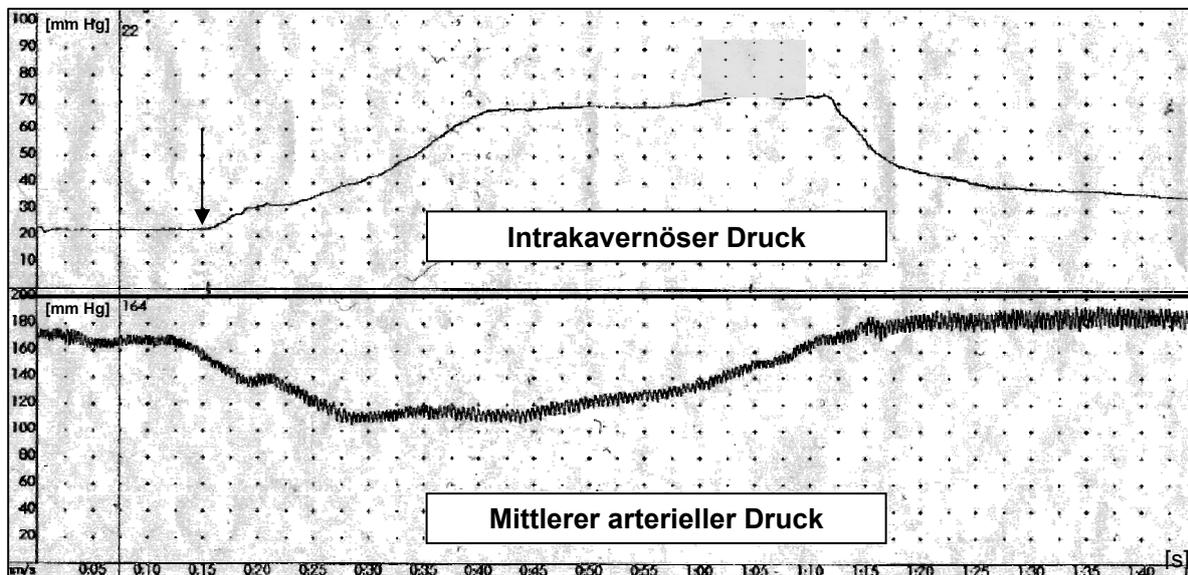


Abb. 23 Registrierung des intrakavernösen und mittleren arteriellen Druckes während der Neurostimulation. Die obere Kurve zeigt den Anstieg des intrakavernösen Druckes nach Stimulationsbeginn (22 mmHg) bis zum Erreichen eines Plateaus (73 mmHg). Die untere Kurve zeigt den Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes mit Absinken parallel zum Stimulationsbeginn.

Zusätzlich findet eine Überwachung des Blutdruckes über einen Katheter in der Schwanzarterie statt, mit dessen Hilfe man den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) bestimmen kann.

3.2.2.6 Perfusion

Nachdem die Funktionsmessungen durchgeführt und dokumentiert worden sind, werden die Tiere für spätere histologische Untersuchungen vorbereitet. Bei allen Ratten wird eine Perfusion mit Paraformaldehyd durchgeführt. Hierzu werden mehrere vorbereitete Flüssigkeitslösungen benötigt:

a) 4% PFA Lösung (1l Endvolumen)

500 ml Wasser werden auf 65°C erhitzt, dann 40 g Paraformaldehyd und 1ml 10M NaOH unter ständigem Rühren hinzugefügt, bis das Paraformaldehyd sich vollständig aufgelöst hat. Danach wird der abgekühlten Lösung 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer hinzugeben und gefiltert (Schleicher&Schuell 597 ½ Faltenfilter, diameter 320 mm). Vor Gebrauch wird die Lösung mit Eis auf ungefähr 4°C gekühlt und der pH-Wert überprüft. Der pH-Wert wird, wenn nötig, auf pH 7,4 korrigiert.

b) 0,2 M Phosphat Puffer Lösung

c) 30% Succrose Lösung

d) Physiologische Kochsalzlösung (9 g NaCl auf 1000 ml)

Zur Perfusion wird eine Pumpe der Marke Regio Analog, Modell ISM 830 (Wertheim-Mondfeld) benutzt (siehe Abb. 24).



Abb.24 Perfusionspumpe: Regio Analog, Modell ISM 830 (Wertheim-Mondfeld).

Vor Benutzung werden die Schläuche mit eisgekühlter Kochsalzlösung gespült und entlüftet. Nach Überprüfung der Narkosetiefe und Einleitung einer zusätzlichen Maskenbeatmung wird der Abdominalschnitt bis unterhalb des Processus xiphoideus verlängert. Nach kranial schließen sich die Zwerchfelle an. Diese werden vorsichtig durchtrennt, und es erfolgt eine bilaterale Thoraxeröffnung mit lateraler Rippendurchtrennung. Die Thoraxwand wird nach

oben geklappt und das Herz freipräpariert. Weiterhin wird die Aorta dargestellt und der ihr von ventral aufliegende Thymus entfernt. Sind alle Strukturen übersichtlich dargestellt, folgt die Eröffnung des Herzmuskels. Dazu wird das Herz von lateral mit einer feinen Klemme, ohne sie zu schließen, locker eingespannt. Eine feine Schere wird benutzt um den linken Ventrikel des Herzmuskels zu eröffnen. Die Perfusionspumpe wird eingeschaltet und sollte mit einer Geschwindigkeit von 25 ml/min eisgekühlte Kochsalzlösung durch den Perfusionschlauch fördern. Durch die entstandene Öffnung wird jetzt der mit einer glattgeschliffenen Kanüle ausgestattete Perfusionschlauch eingeführt und unter eingeschalteter Pumpe vorsichtig ohne größeren Druck durch den linken Ventrikel der linke Vorhof und schließlich die Aorta mit der Kanüle sondiert (siehe Abb. 25).

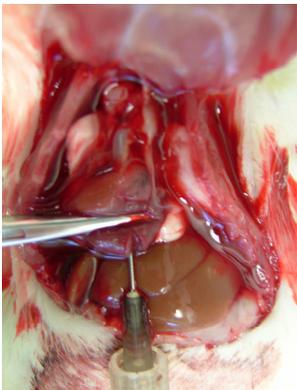


Abb. 25 Eröffnung des linken Ventrikels mit Einführung der Perfusionskanüle.

Sobald die Kanüle die richtige Position erreicht hat, wird die Klemme geschlossen. Das Schließen der Klemme fixiert die Kanüle und verhindert den Rückstrom des Blutes bzw. der Perfusionsflüssigkeit (siehe Abb. 26). Nach Überprüfung der Lage der Perfusionskanüle und der intakten Pumpleistung wird als letzter Schritt der rechte Vorhof mit einer feinen Schere durch einen kleinen Schnitt eröffnet, damit die perfundierende Flüssigkeit, die durch die Aorta über den großen Kreislauf kommt, dort ablaufen kann. Die Perfusionspumpe sollte nun für etwa zehn Minuten eisgekühlte Kochsalzlösung durch das Gefäßsystem der Tiere pumpen, es sollte darauf geachtet werden, dass die Flüssigkeit, welche aus dem rechten Vorhof kommt eine immer transparentere Farbe annimmt. Nach zehn Minuten Perfusion mit Kochsalzlösung wird die Perfusionsflüssigkeit auf die Paraformaldehydlösung umgestellt. Die Perfusion mit Paraformaldehyd sollte nicht kürzer als 15 Minuten betragen. Hierbei ist ständig auf die korrekte Lokalisation der Perfusionskanüle zu achten. Nach Ablauf der geforderten Zeit wird die Perfusionspumpe abgeschaltet und die Ratten von den Geräten diskonnektiert.

Teile des Schwellkörpers werden entfernt. Der für die weiteren Untersuchungen interessante Bereich von Prostata bis Glans penis wird minimiert und in Paraformaldehydlösung über 24 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der 24 Stunden wird die Paraformaldehydlösung gegen Succroslösung (s.o.) ausgetauscht und die Tiere in luftdichten Gefäßen mit dieser Lösung im Kühlschrank bei circa 4°C für die folgenden histologischen Untersuchungen belassen.

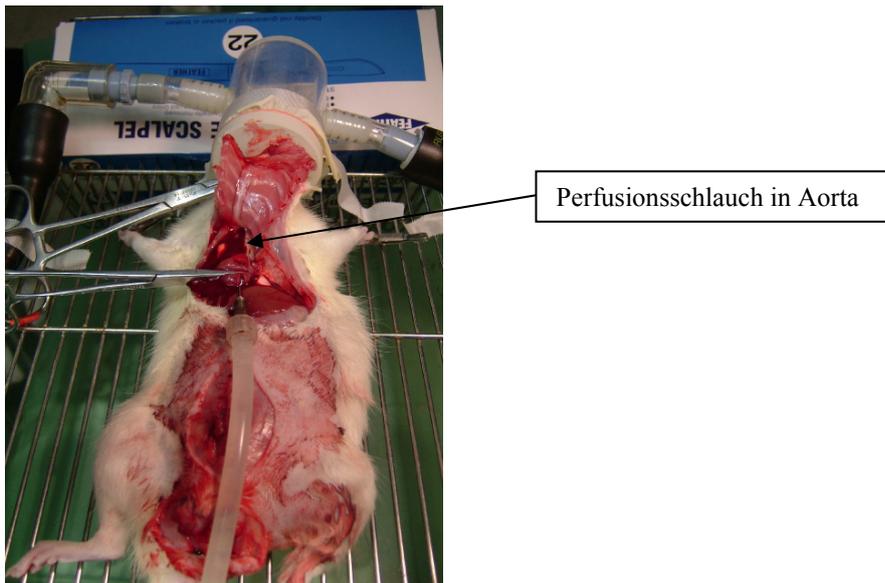


Abb. 26 Perfusion eines Versuchstiers mit Paraformaldehydlösung.

3.2.2.7 Präparation des Corpus cavernosum

Der Schwellkörper wird, wie in Abb. 27 dargestellt, freipräpariert und entnommen. Sofort nach der Entnahme wird er in eiskalter PBS (Phosphat gepufferter Kochsalzlösung) gewaschen und in 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke zerschnitten. Danach werden die Stücke in mit 5 ml RNAlater-Lösung (Ambion, Austin, TX) gefüllte Glasgefäße gelegt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag, wenn das Gewebe durch die Lösung inkubiert worden ist, wird das Glasgefäß mit enthaltener RNAlater-Lösung und Gewebe bei -20°C eingefroren. Wichtig ist, dass das Gewebe sofort nach Entnahme in die Lösung gelegt wird, da es sonst zu einer Degradation der RNA kommt und eine spätere Quantifizierung des Gewebes somit verfälscht wird.

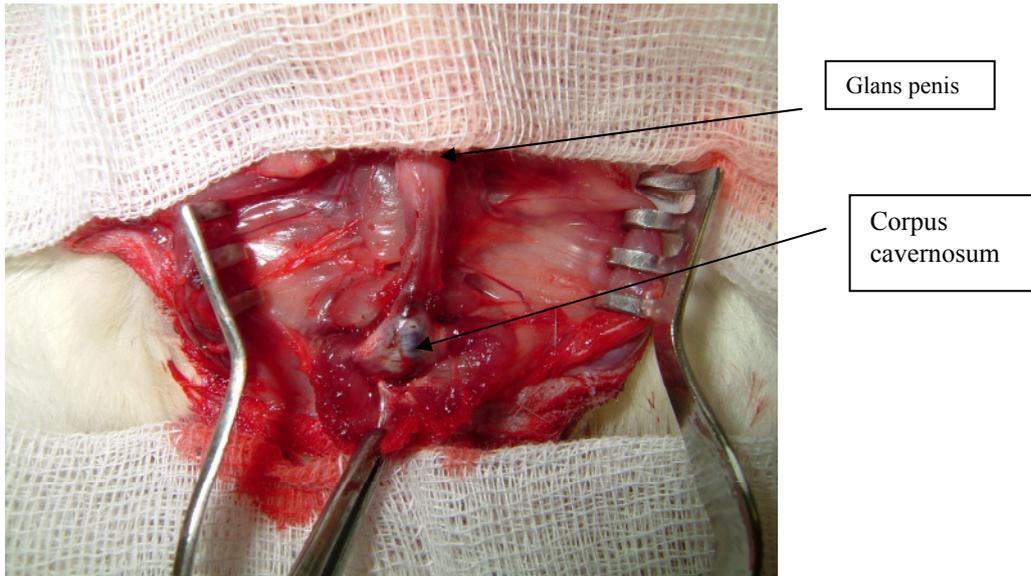


Abb. 27 Schwellkörperpräparation intraoperativ.

3.2.2.8 Aufreinigung Schwann-Zellen:

Kulturen von primären SC aus dem N. ischiadicus wurden von Dr. Weidner, Neurologische Klinik, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt und entsprechend der folgenden etablierten Protokolle erstellt (Weidner, 1999, Vroemen, 2003) (siehe Abb. 28). Narkotisierten Ratten vom Stamm Fischer 344 werden 3,5 cm lange Segmente des N. ischiadicus entnommen und mit eiskalter Hank's-Lösung (Hank's balanced salt solution HBSS, PAA Laboratories Österreich) gewaschen. Die Nervensegmente befreit man vom Epineurium und zerteilt sie in jeweils 1 mm große Stücke. Diese Nervenstücke werden auf Platten mit Kollagenbeschichtung Typ 1 (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Pan Biotech, Aidenbach), die mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Pan Biotech, Aidenbach) und mit Penicillin/Streptomycin (100 U Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, Pan Biotech, Aidenbach) angereichert sind, übertragen. Die Kulturen werden in einem Inkubator bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂ gebracht. Nach 7 Tagen erfolgt eine Übertragung auf 24 Loch-Platten, die 500 μl Hank's balanced salt solution (HBSS) mit 3% Trypsin, 1% Kollagenase und 1% Hyaluronidase (alle von Sigma, Seelze) pro Loch enthalten. Es erfolgt eine zweistündige Inkubation bei 37°C. Die Gewebefragmente werden dann mit einer sterilen 20-Gauge-Nadel getrennt. Die entstandene Suspension wird für 10 min bei Raumtemperatur mit 120 G zentrifugiert. Es erfolgt eine Übertragung in das Standardmedium und ein Zerteilen mit einer 22-Gauge-Hautnadel. Die daraus resultierende Zellsuspension wird auf Polyornithin/Laminin beschichteten Kulturflaschen mit Standardmedium für 2 Tage kultiviert. Durch magnetisch aktivierte Zelltrennung (magnetic-

activated cell separation MACS, Miltenyi Biotec Deutschland) und mit speziellen anti-p75LNGFr-Antikörpern (Chemicon Deutschland) lassen sich SC von Fibroblasten trennen und zu 95% reine Kulturen an SC erreichen. Die SC werden bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -76°C eingefroren. Nach dem Auftauen gibt man die Zellen in ein Röhrchen mit 5 ml Expansionsmedium. Bei 300 G wird für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Man fügt 10 ml Expansionsmedium hinzu und zählt aus 50 μl die Zellen aus. Der Inhalt wird in eine große Flasche (Cellstar Gewebekulturflasche 250 ml, 75 cm^3 Nr. 658175, Greiner Bio-one, Frickenhausen) abgefüllt, 5 ml Medium hinzugefügt und die Zellen für eine Woche kultiviert. In dieser Zeit findet einmalig ein Mediumwechsel statt. Nach einer Woche lassen sich die Zellen splitten, das Medium wird abgesaugt und 15 ml PBS zum Spülen hinzugegeben. Zu den gesplitteten Zellen kommen 5 ml Trypsin (Trypsin EDTA, Biochrom A, Berlin) und diese verbleiben bei 37°C für 5 min im Brutschrank. Dann werden 5 ml Standardmedium hinzugefügt und die Zellen in 10 ml Röhrchen abzentrifugiert. Nach dem Auszählen lassen sich 0,5 Mio. Zellen einsetzen. Der gesamte Vorgang des Splittens wird noch zweimal wiederholt. Die Zellen werden nach dem Auszählen abzentrifugiert und auf eine Konzentration von 25.000 Zellen/ μl eingestellt und dann in die Silikonröhrchen verpflanzt.

Die zurechtgeschnittenen Silikonröhrchen werden einzeln in Alufolie verpackt und für 20 min bei 121°C (Tuttnauer Autoclave-Steam-Sterilizer) autoklaviert. Die Zellsuspension lässt sich in einer Eppendorfpipette aufziehen und durch die Kapillarkraft in die 0,5 cm langen Röhrchen füllen. Die gefüllten Röhrchen werden in eine 6 Loch-Platte (Cellstar TC 6well-Platte, Nr. 657160, Greiner Bio-one, Frickenhausen) überführt (dabei maximal 2 Röhrchen pro Loch) und mit 2 ml Standardmedium bedeckt. Die Platte wird für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 bebrütet. Direkt vor dem Implantieren wird das Medium entfernt und die Röhrchen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen werden (Caspers C, 2004).

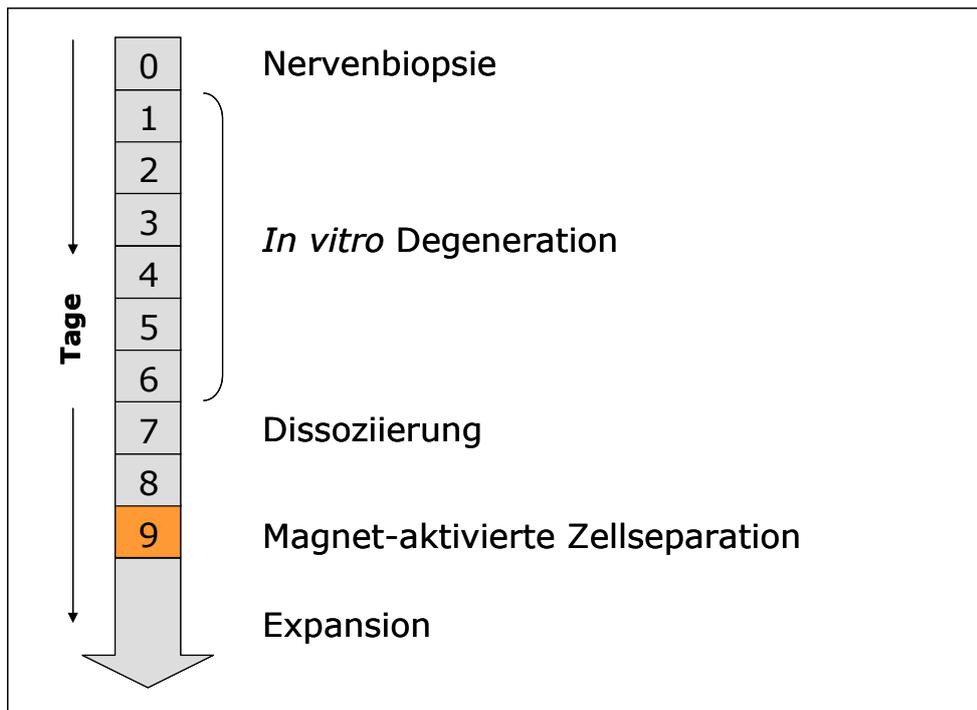


Abb. 28 Zeitplan der Aufreinigung primärer SC aus dem Nervus ischiadicus adulter Ratten. Nach Entnahme einer Nervenbiopsie folgt die Degeneration des Nervs *in vitro*. Am 7. Tag werden Nervenfragmente zur Dissoziation gebracht. Zwei Tage später erfolgt durch die magnet-aktivierte Zellseparation die Aufreinigung p75LNGFR-exprimierender SC aus dem Zellgemisch. Die Effizienz der Aufreinigung wird mittels Durchflußzytometrie und Immunzytochemie überprüft (Vroemen und Weidner, 2003).

Transduktion von Schwann-Zellen mit retroviralen Vektoren für GDNF:

Aus dem N. ischiadicus von Fischer 344 Ratten werden syngene SC durch magnetunterstützte Zellseparation aufgereinigt (Vroemen M, 2003) und entsprechend standardisierter Protokolle kultiviert (Kuhlengel, 1990). Die Reinheit der Schwannschen Zellkulturen wird mit immunhistochemischen Markern überprüft (p75, S100, Fibronectin). Zunächst werden hochtitrige Virus-Überstände erzeugt, welche das Transgen für GDNF (oder Neurturin) enthalten. Retrovirale Vektoren werden durch Ko-Transduktion des retroviralen Plasmids pLXSN, welches das Transgen enthält, und das Plasmid pHCMV-G, welches das Hüllprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) enthält, in die Produktionszelle mittels CaPO_4 -Präzipitierung kotransduziert (Blesch, 2003). Virus-Titer im Überstand werden durch Verdünnungsserien an NIH3T3-Zellen bestimmt. Virale Überstände können bei -70°C bis zum Gebrauch aufbewahrt werden. Virale Vektoren werden aus Zellkultur-Überständen aufgereinigt und durch Ultrazentrifugierung konzentriert. Dadurch können Virustiter $>10^9$ cfu erzielt werden. Die Überstände werden abgenommen, durch $0.45\ \mu\text{m}$ Filter gereinigt und schließlich bei $50000 \times g$ über 90 Minuten zentrifugiert. Die Pellets werden in 50mM Tris-

HCl pH 7.8/130mM NaCl/1mM EDTA resuspendiert. SC werden einen Tag vor der Transduktion 1:3 geteilt. Nach Zugabe von Polybren zum Medium (finale Konzentration 1µg/ml) werden die konzentrierten Viruspartikel dem Medium hinzugefügt. Die Transduktion wird über den Zeitraum von 2-3 Tagen durchgeführt. Um die Zellen zu selektieren, welche das Transgen integriert haben, wird G418 zugegeben. Zur Bestimmung der GDNF-Protein-Expression werden Lysate transduzierter Zellen mit einem spezifischem GDNF-ELISA untersucht.

Standardmedium:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	500 ml
10% fetales Kälberserum	55 ml
L-Glutamin	5,5 ml
Penicillin/Streptomycin	5,5 ml
(100 IU Penicillin G, 100 µg/ ml Streptomycin, Pan Biotech, Aidenbach)	

Expansionsmedium:

Forskolin (F6886 10 mg, MW= 4105,5 g/ mol, Sigma San Diego)	550 µl
12,2 ml ETOH zu 10 mg geben.	
Boviner Hypophysenextrakt (CC4009, 2 ml, Cloneitcs San Diego)	1 ml
Den Extrakt auftauen und 1 ml zum Standardmedium hinzufügen, den Rest verwahren.	

Poly-Ornithin/Laminin-beschichtete Zellkulturflaschen:

Verwendete Materialien:

Steriles Aqua dest., PBS-Puffer (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung), Poly-Ornithin 30.000-40.000 mw, (P 3655, Sigma Seelze), Gereinigtes Mäuselaminin, (L 2020, Sigma Seelze) (Aufbewahrung bei -80°C)

Beschichtung:

Poly-Ornithin wird in einer Konzentration von 250 µg/ml in steriles Aqua dest. gegeben. Den Boden einer Zellkulturflasche bedeckt man mit ausreichend Poly-Ornithin-Lösung und inkubiert die Lösung für ein bis zwei Stunden bei 37°C. Die Flasche wird zweimal mit Aqua dest. gespült. Das tiefgefrorene Laminin muss langsam auf Eis aufgetaut werden und mit PBS auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt werden. Der Boden einer Kulturflasche wird mit der fertigen Laminin-Lösung komplett bedeckt und die Flasche für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach kann man die Laminin-Lösung absaugen und die Flasche sofort verwenden.

Wird die Flasche nicht zum sofortigen Gebrauch hergestellt, so muss der Boden der Flasche mit PBS vollständig bedeckt werden und kann für maximal 3 Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.

4. Statistik und Dokumentation

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Erektion optisch

Die Elektrostimulation erfolgte wie im Methodenteil (3.2.2.4 Elektrostimulation) beschrieben. Die Erektion wird nach Elektrostimulation optisch auf jeder Seite getrennt analysiert und einzeln ausgewertet. Dabei wird eine Größenzunahme in Länge und Breite, Blaufärbung, Versteifung oder Aufrichtung des Penis als positiv in Bezug auf die Erektion bewertet (siehe Abb. 29).

Eine qualitative Unterscheidung in einzelne Formen, Stärke oder Dauer der Erektion werden nicht getroffen. Auch eine auftretende Ejakulation wird nicht extra bewertet. Es findet eine reine Beurteilung in positiv oder negativ statt.

positive Erektion (+): ja

keine Erektion (-): nein



Abb. 29 Bildbeispiel für eine positive Erektion mit Größenzunahme und Blaufärbung.

Funktionelle Ergebnisse:

Gruppe	n (Tierzahl)	Stimulationen	Erektionen	Erektionen (%)
SC+GDNF	7	14	11	78
SC	7	14	11	78
Trans	7	14	6	42
Sham	10	20	20	100
Nervex	12	24	0	0

Tab. 4 Funktionelle Ergebnisse der verschiedenen OP-Gruppen 6 Wochen nach der Primäroperation.

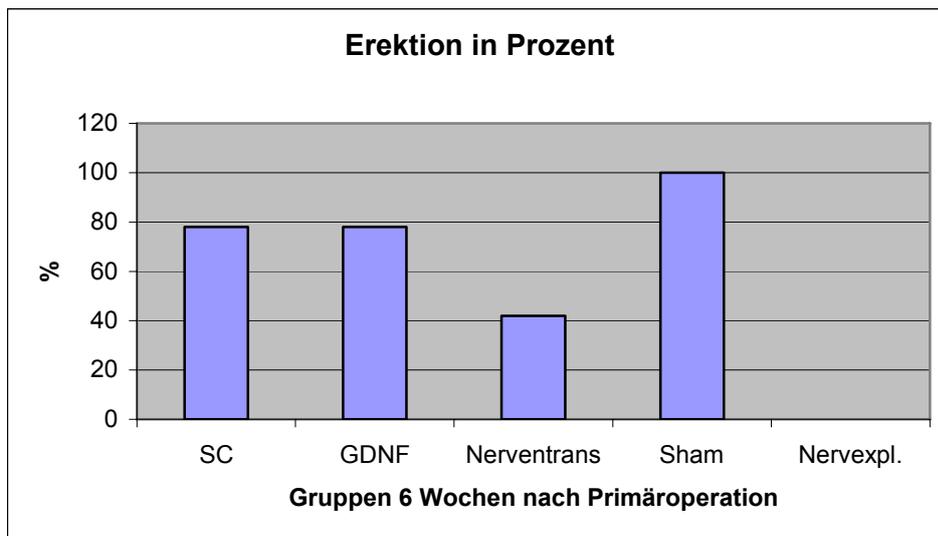


Abb. 30 Wiederherstellung der erektilen Funktion nach bilateraler Exzision kaverner Nervensegmente und Rekonstruktion. Nach einem postoperativen Intervall von sechs Wochen wurden die Tiere relaparotomiert, und es erfolgte die seitengetrennte Elektrostimulation der rekonstruierten Nerven proximal der Läsionsstelle. Die Nervautotransplantation führte in 42%, die Verwendung SC-beschichteter Leitschienen in 78%, die Verwendung GDNF-überexprimierender SC in 78% zu Erektionen. Während in der Ablationsgruppe (negative Kontrolle) keine Erektionen auslösbar waren, lag die Erektionsrate in der Sham-Gruppe (Positiv-Kontrolle) bei 100%.

4.1.2 Intrakavernöse Druckmessung

Während bilateraler Elektrostimulation (3.2.2.3 Elektrostimulation) wird der Druck im Schwellkörper über die im Methodenteil beschriebene Weise bestimmt (3.2.2.5 Intrakavernöse Druckmessung).

Neben intrakavernösem Druck vor elektrischer Neurostimulation (Basisdruck), dem maximal erreichten intrakavernösen Druck ($p(\max)$) während elektrischer Stimulation, wird zusätzlich auch der systemische Druck (MAP) über einen Katheter in der Schwanzarterie der Ratte bestimmt. Zusätzlich wird die Zeit nach Stimulationsbeginn angegeben, nachdem der höchste Druck erreicht wird (dt). Einzelergebnisse der Ratten bei Elektrostimulation siehe unten:

Ergebnisse SC + GDNF-Gruppe sechs Wochen nach Primär-OP:

Ratte	Stim. Ort	Erektion	Basisdruck	dp	dt	p (max)	MAP
1	Ganglion li.	nein	26 mmHG	10 mmHG	/	36 mmHG	105 mmHG
	Ganglion re.	ja	17 mmHG	46 mmHG	51 s	63 mmHG	132 mmHG
2	Ganglion li.	nein	22 mmHG	2 mmHG	/	24 mmHG	106 mmHG
	Ganglion re.	nein	24 mmHG	6 mmHG	/	30 mmHG	102 mmHG
3	Ganglion li.	ja	16 mmHG	38 mmHG	32 s	54 mmHG	128 mmHG
	Ganglion re.	ja	7 mmHG	65 mmHG	28 s	72 mmHG	159 mmHG
4	Ganglion li.	ja	16 mmHG	59 mmHG	35 s	75 mmHG	155 mmHG
	Ganglion re.	ja	12 mmHG	34 mmHG	77 s	46 mmHG	119 mmHG
5	Ganglion li.	ja	8 mmHG	41 mmHG	43 s	49 mmHG	97 mmHG
	Ganglion re.	ja	9 mmHG	31 mmHG	60 s	40 mmHG	97 mmHG
6	Ganglion li.	ja	10 mmHG	29 mmHG	82 s	39 mmHG	121 mmHG
	Ganglion re.	ja	9 mmHG	33 mmHG	62 s	42 mmHG	141 mmHG
7	Ganglion li.	ja	16 mmHG	42 mmHG	40 s	58 mmHG	96 mmHG
	Ganglion re.	ja	22 mmHG	33 mmHG	38 s	55 mmHG	92 mmHG

Tab. 5 Einzelergebnisse der Tiere mit Rekonstruktionsversuch durch mit GDNF- überexprimierenden SC-beschichteten Silikonröhrchen sechs Wochen nach der Primäroperation. Dabei erfolgten optische Kontrollen, die intrakavernöse Druckmessungen vor elektrischer Stimulation (Basisdruck), sowie die Bestimmung des maximalen Drucks unter Stimulation (p(max)). Weiterhin wurde die Zeit (dt) nach Stimulationsbeginn bis zum Erreichen des p(max) und der Mittlere arterielle Blutdruck (MAP) über einen Katheter bestimmt.

Ergebnisse Trans-Gruppe sechs Wochen nach Primär-OP:

Ratte	Stim. Ort	Erektion	Basisdruck	dp	dt	p (max)	MAP
I	Ganglion li.	nein	20 mmHG	1 mmHG	/	21 mmHG	97 mmHG
	Ganglion re.	ja	21 mmHG	7 mmHG	72 s	28 mmHG	111 mmHG
II	Ganglion li.	ja	4 mmHG	12 mmHG	75 s	16 mmHG	83 mmHG
	Ganglion re.	nein	17 mmHG	/ mmHG	/	17 mmHG	98 mmHG
III	Ganglion li.	nein	10 mmHG	/ mmHG	/	10 mmHG	121 mmHG
	Ganglion re.	ja	12 mmHG	21 mmHG	80 s	33 mmHG	128 mmHG
IV	Ganglion li.	ja	27 mmHG	3 mmHG	47 s	62 mmHG	125 mmHG
	Ganglion re.	ja	24 mmHG	16 mmHG	/	40 mmHG	87 mmHG
V	Ganglion li.	ja	18 mmHG	31 mmHG	52 s	49 mmHG	115 mmHG
	Ganglion re.	nein	20 mmHG	/ mmHG	/	20 mmHG	118 mmHG
VI	Ganglion li.	nein	10 mmHG	12 mmHG	/	22 mmHG	96 mmHG
	Ganglion re.	nein	10 mmHG	/ mmHG	/	10 mmHG	108 mmHG
VII	Ganglion li.	nein	11 mmHG	0 mmHG	/	11 mmHG	162 mmHG
	Ganglion re.	nein	16 mmHG	0 mmHG	/	16 mmHG	168 mmHG

Tab. 6 Einzelergebnisse der Tiere mit Rekonstruktionsversuch durch Transplantation des N. genitofemoralis sechs Wochen nach Primäroperation. Dabei erfolgten optische Kontrollen, die intrakavernöse Druckmessungen vor elektrischer Stimulation (Basisdruck), sowie die Bestimmung des maximalen Drucks unter Stimulation (p(max)). Weiterhin wurde die Zeit (dt) nach Stimulationsbeginn bis zum Erreichen des p(max) und der Mittlere arterielle Blutdruck (MAP) über einen Katheter bestimmt.

Ergebnisse SC-Gruppe sechs Wochen nach Primär-OP:

Ratte	Stim. Ort	Erektion	Basisdruck	dp	dt	p (max)	MAP
A	Ganglion li.	ja	10 mmHG	34 mmHG	35 s	44 mmHG	121 mmHG
	Ganglion re.	nein	8 mmHG	2 mmHG	/	10 mmHG	150 mmHG
B	Ganglion li.	ja	19 mmHG	43 mmHG	27 s	62 mmHG	122 mmHG
	Ganglion re.	ja	17 mmHG	64 mmHG	36 s	81 mmHG	155 mmHG
C	Ganglion li.	ja	25 mmHG	36 mmHG	34 s	61 mmHG	100 mmHG
	Ganglion re.	ja	18 mmHG	28 mmHG	31 s	46 mmHG	151 mmHG
D	Ganglion li.	nein	11 mmHG	/ mmHG	/	11 mmHG	/ mmHG
	Ganglion re.	ja	11 mmHG	31 mmHG	25 s	42 mmHG	/ mmHG
E	Ganglion li.	nein	20 mmHG	15 mmHG	55 s	35 mmHG	101 mmHG
	Ganglion re.	ja	16 mmHG	29 mmHG	36 s	45 mmHG	114 mmHG
F	Ganglion li.	ja	22 mmHG	48 mmHG	53 s	70 mmHG	111 mmHG
	Ganglion re.	ja	12 mmHG	30 mmHG	62 s	42 mmHG	123 mmHG
G	Ganglion li.	ja	10 mmHG	32 mmHG	55 s	42 mmHG	134 mmHG
	Ganglion re.	ja	6 mmHG	24 mmHG	62 s	30 mmHG	132 mmHG

Tab. 7 Einzelergebnisse der Tiere mit Rekonstruktionsversuch durch mit SC-beschichteten Silikonröhrchen sechs Wochen nach der Primäroperation. Dabei erfolgten optische Kontrollen, die intrakavernöse Druckmessungen vor elektrischer Stimulation (Basisdruck), sowie die Bestimmung des maximalen Drucks unter Stimulation (p(max)). Weiterhin wurde die Zeit (dt) nach Stimulationsbeginn bis zum Erreichen des p(max) und der Mittlere arterielle Blutdruck (MAP) über einen Katheter bestimmt.

Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind in folgender Tabelle zusammengestellt

	Basisdruck [mmHg] MW(±SD)	Druckanstieg [mmHg] MW(±SD)	Maximal- Druck nach sec. MW(±SD)	Maximal- Druck [mmHg] MW(±SD)	Blutdruck [mmHg] MW(±SD)
SC +GDNF	15,28 (±6,12)	33,50 (±17,47)	49,81 (±17,38)	48,78 (±14,48)	117,85 (±21,54)
Trans	15,71 (±6,20)	8,21 (±9,27)	65,20 (±13,17)	25,36 (±15,03)	108,36 (±22,30)
Sham	15,40 (±6,06)	52,80 (±23,88)	63,10 (±42,00)	68,20 (±28,31)	123,24 (±30,79)
Nervex	18,30 (±8,63)	11,50 (±21,53)	43,11 (±29,36)	29,80 (±20,49)	111,05 (±22,85)
SC	14,64 (±5,50)	27,54 (±17,41)	42,58 (±13,15)	44,36 (±19,26)	126,16 (±17,94)

Tab. 8 Mittelwerte und Standardabweichungen des Basisdrucks, des Druckanstiegs, des Maximaldruck, der Zeit nach Stimulationsbeginn bis zum Erreichen des Maximaldrucks, und des Mittleren arteriellen Blutdrucks bei den verschiedenen OP-Gruppen.

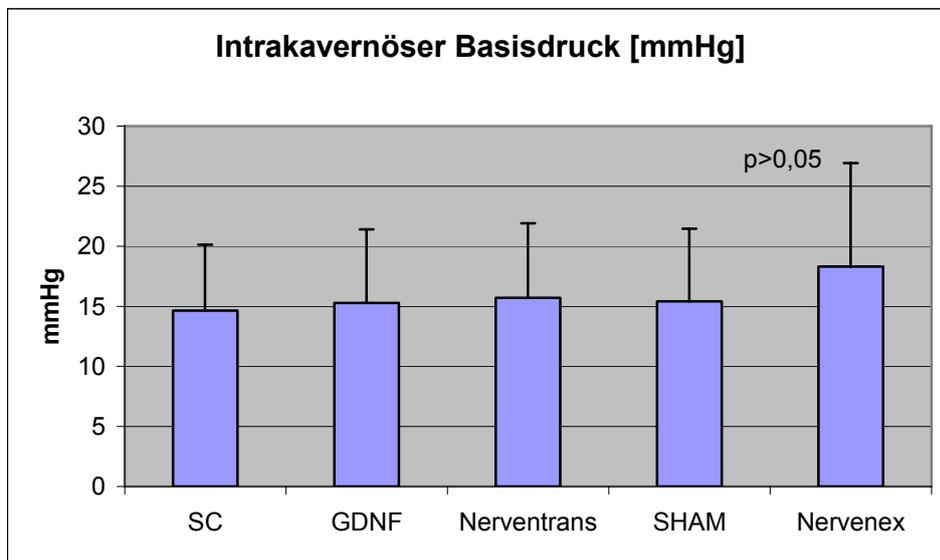


Abb. 31 Mittelwerte der intrakavernösen Basisdrücke (mmHg).

Darstellung der verschiedenen OP-Gruppen bei Relaparatomie mit elektrischer seitengetrennter Nervenstimulation sechs Wochen nach bilateraler Nervensegmentresektion, bzw. Sham-Gruppe (Positivkontrolle): alleinige Laparatomie ohne Exzision. Statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$).

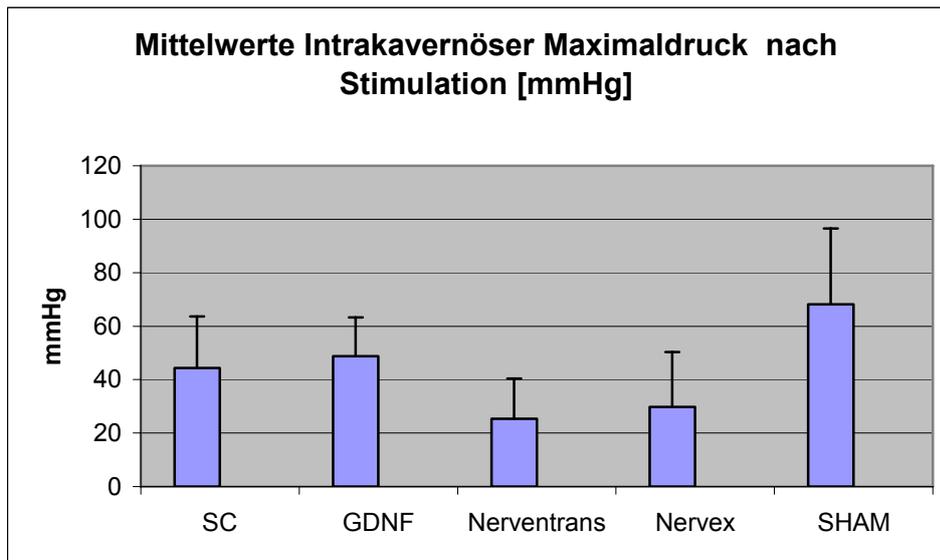


Abb. 32 Mittelwerte der intrakavernösen Maximaldrücke [mmHg] nach Stimulation.

Darstellung der verschiedenen OP-Gruppen bei Relaparatomie mit elektrischer seitengetrennter Nervenstimulation sechs Wochen nach bilateraler Nervensegmentresektion, bzw. Sham-Gruppe (Positivkontrolle) alleinige Laparatomie ohne Exzision. Hierbei werden die höchsten intrakavernösen Maximaldrücke in der Sham-Gruppe gemessen. Niedrige intrakavernöse Maximaldrücke finden sich bei den Tieren mit autologer Nervenretransplantation und den Tieren mit bilateraler Exzision der erektilen Nerven (Nervex) ohne Rekonstruktion. Der mittlere intrakavernöse Druckanstieg nach Implantation Schwann-Zell-beschichteter Leitschienen, sowie GDNF überexprimierender Schwann-Zell-beschichteter Leitschienen unterschied sich von Tieren nach einer Sham-Operation statistisch nicht signifikant ($p=0,3$). Dagegen wurde bei Tieren nach Implantation von Nervautotransplantation, sowie bei Tieren der Nervex-Gruppe ein signifikant niedriger Druckanstieg gemessen ($p<0,001$)

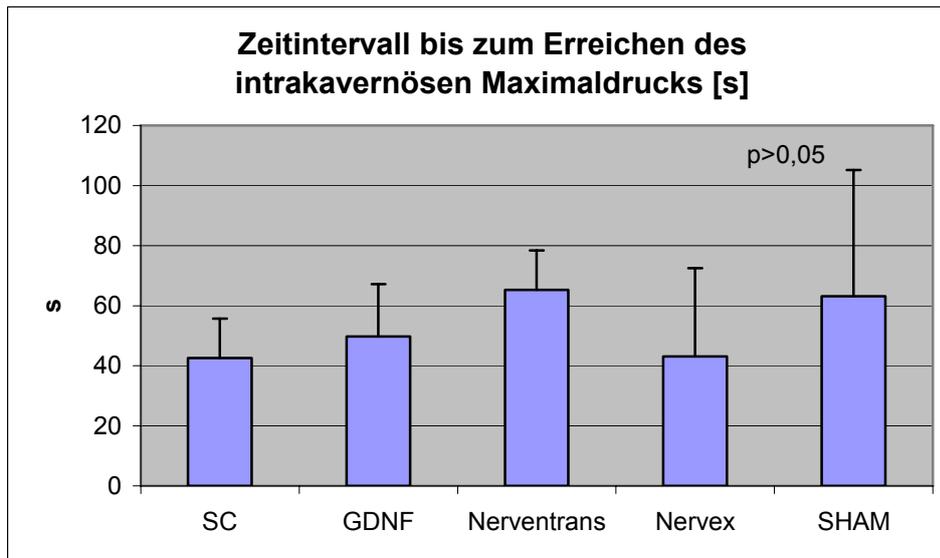


Abb. 33 Mittelwerte der Zeit [s], welche nach Stimulationsbeginn benötigt wurde, den intrakavernösen Maximaldruck zu erreichen. Darstellung der verschiedenen OP-Gruppen bei Relaparatomie mit elektrischer seitengetrennter Nervenstimulation sechs Wochen nach bilateraler Nervensegmentresektion, bzw. Sham-Gruppe: (Positivkontrolle) alleinige Laparatomie ohne Exzision. Statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$).

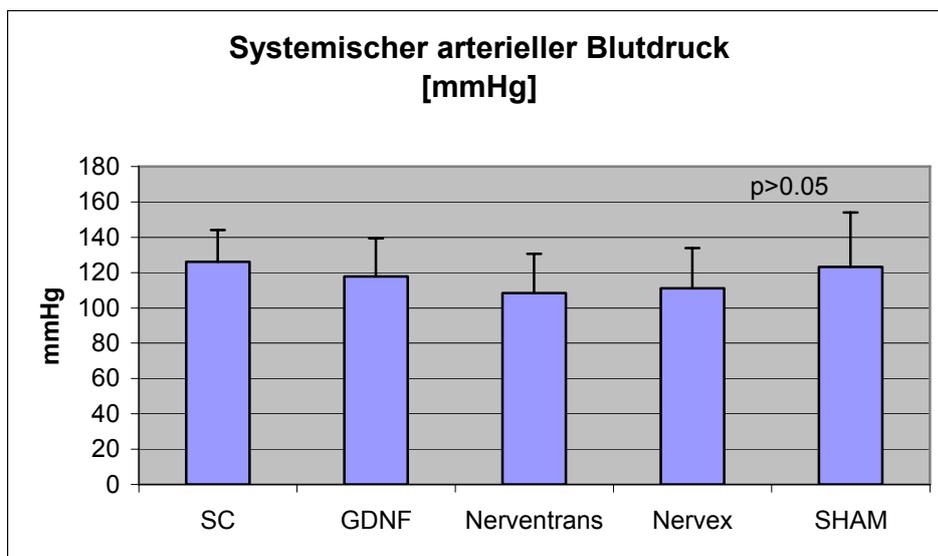


Abb. 34 Mittelwerte des systemischen Blutdrucks [mmHg]. Darstellung der verschiedenen OP-Gruppen bei Relaparatomie mit elektrischer seitengetrennter Nervenstimulation sechs Wochen nach bilateraler Nervensegmentresektion, bzw. Sham-Gruppe (Positivkontrolle): alleinige Laparatomie ohne Exzision. Statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$).

4.1.3 Relative Quantifizierung der Stickstoffmonoxidsynthasen durch Real Time reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Die relativen Quantifizierungen der Stickstoffmonoxidsynthasen wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Dieter Saur (Klinikum Rechts der Isar) durchgeführt. Hierbei wurde die Methode der Real Time RT-PCR verwendet und die verschiedenen Typen der Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) im Verhältnis zu einem Referenz-Gen im Gewebe bestimmt.

So stellt PGP9.5 den Marker im Gewebe dar, der für neuronales Gewebe steht; wohingegen der global exprimierte GAPDH-Marker für eine Normalisierung gegen das Gesamtgewebe verwendet werden kann.

Quantifizierungen:

4.1.3.1 Relative Quantifizierung der RNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP9.5“:

SC+GDNF- Gruppe (Gruppentiere mit arabischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattenname	1	5	7	6
Relative RNA-Expression rnNOS/rPGP 9.5	0,36487485 0,38442710 0,41348453	1,03658742 0,99717345 0,98717196	1,43156059 1,56741621 1,39896586	0,56942986 0,54776724 0,56928538
MW	0,3844271	1,00697761	1,46598089	0,56216082
SD	0,4134845	0,02612591	0,08934455	0,01246542

Tab. 9 Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP 9.5“ innerhalb der Nervenrekonstruktionsgruppe mit GDNF-überexprimierenden SC-beschichteten Silikonröhrchen; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

SC-Gruppe (Gruppentiere mit Großbuchstaben gekennzeichnet):

Rattename	A	B	C	D
Relative RNA- Expression rnNOS/rPGP 9.5	0,35063272 0,34910864 0,34112247	0,41766514 0,42313545 0,35382184	0,63557663 0,70755360 0,73131788	0,30510207 0,28605844 0,30404839
MW	0,34695461	0,39820748	0,69148271	0,29840297
SD	0,00510794	0,03853628	0,04985280	0,01070364

Tab. 10 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP 9.5“ innerhalb der Nervenrekonstruktionsgruppe mit SC beschichteten Silikonröhrchen; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Trans-Gruppe (Gruppentiere mit römischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	I	II	III	V
Relative RNA- Expression rnNOS/rPGP 9.5	0,17828098 0,19605761 0,15821892	0,21032092 0,17247656 0,19944921	0,25437261 0,23549679 0,2484269	0,18018616 0,21276288 0,21994247
MW	0,17751917	0,19408223	0,24609877	0,20429717
SD	0,01893085	0,01948467	0,00965087	0,02118708

Tab. 11 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP 9.5“ innerhalb der Nervenrekonstruktionsgruppe mit autologer Nervenretransplantation des N. genitofemoralis; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Kontroll-Gruppen:

Rattename	SHAM	Nervex 1	Nervex 2	Nervex 3
Relative RNA-Expression rnNOS/rPGP 9.5	0,58983328 0,50624851 0,41180434	0,08495494 0,08578021 0,08598951	0 0 0	0,11810872 0,12025242 0,11962377
MW	0,50262871	0,08557489	0	0,11932830
SD	0,08906966	0,00054699	0	0,00110197

Tab. 12 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP 9.5“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus den **Kontroll-Gruppen**; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Optische Darstellung der relativen Quantifizierung der RNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP 9.5“ (Tab.9-12) der Einzeltiere:

rnNOS/PGP9.5 Einzeltiere nach OP- Gruppen geordnet

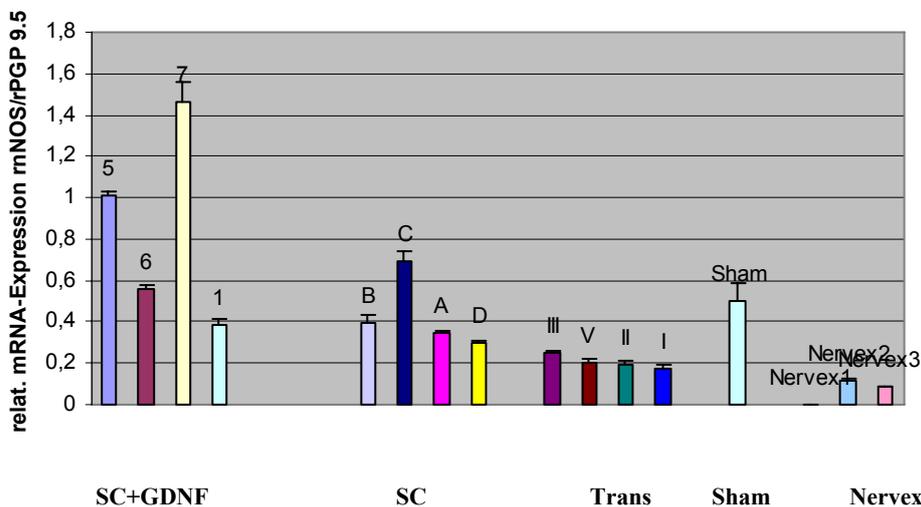


Abb. 35 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen RNA-Expression nNOS zum neuronalen Marker „PGP9.5“ (Tab. 9-12); dabei sind die Einzeltiere nach den verschiedenen OP-Gruppen geordnet dargestellt. Hierbei fällt bei den Einzeltieren eine erhöhte nNOS-Expression gegenüber der Sham-Gruppe (Positivkontrolle ohne Nervenexzision) in der SC+GDNF Gruppe, sowie eine deutlich verminderte nNOS-Expression in der Nervenexzisionsgruppe ohne Rekonstruktionsversuch auf. Mittelwerte der Gruppen siehe Abb. 36.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Versuchstiere je nach OP in verschiedene Gruppen (SC, SC+GDNF, Trans, Sham, Nervex) zusammengefasst. Indem die Mittelwerte der Gruppentiere berechnet wurden, kann man die einzelnen Gruppen miteinander vergleichen. Die Mittelwerte der Gruppen sind in Tab. 13 zu finden. Eine optische Darstellung zeigt Abb.36.

Mittelwerte der Relative Quantifizierung der RNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP9.5“ der verschiedenen Gruppen

Gruppe	nNOS/ PGP9.5	
	MW	SD
SC+GDNF	0,85567	0,48326
Trans	0,20549	0,02923
Sham	0,50260	0,08906
Nervex	0,06833	0,06152
SC	0,43376	0,17658

Tab. 13 Mittelwerte der Relativen Quantifizierung der RNA-Expression nNOS gegen den neuronalen Marker „PGP9.5“ der verschiedenen OP-Gruppen (GDNF>Sham>SC>Trans>Nervex), diese Mittelwerte wurden aus den in den Tab. 9-12 aufgeführten Ergebnissen der Einzeltiere gebildet und stellen die Mittelwerte der Gesamtgruppe dar.

Optische Darstellung Mittelwerte mNOS/rPGP9.5 (Tab. 13) der verschiedenen OP-Gruppen:

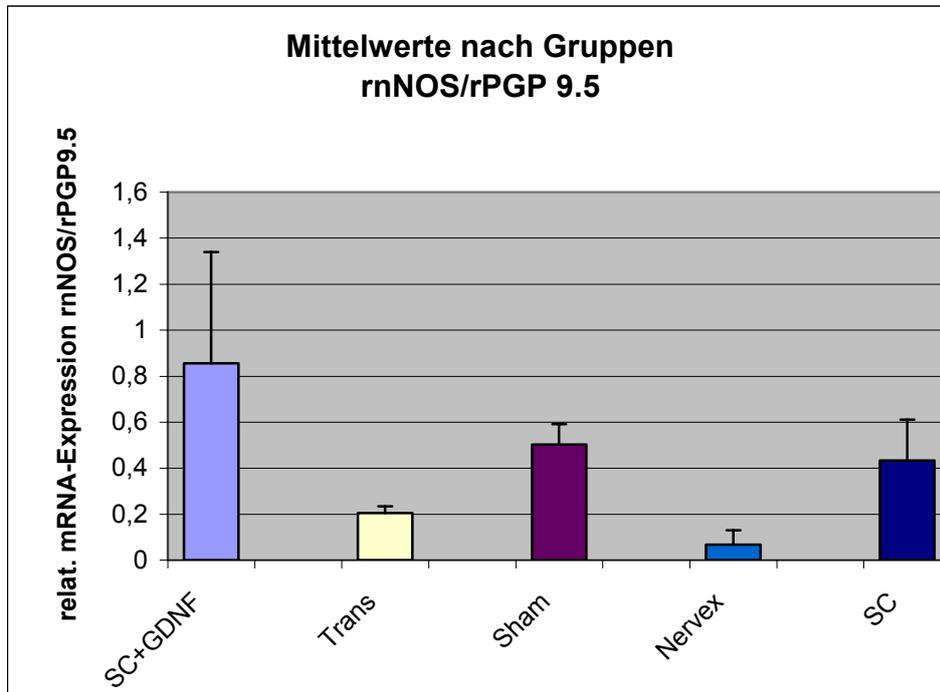


Abb. 36 Mittelwerte relative mRNA-Expression rnNOS/rPGP9.5 der verschiedenen Rekonstruktionsgruppen.

Die Abb. zeigt die Mittelwerte der nNOS-Expression zum neuronalen Marker „PGP 9.5“, die Mittelwerte wurden aus den Einzeltieren (siehe Abb.35) berechnet. In der Abb. fällt eine signifikant vermehrte nNOS-Expression bei der Rekonstruktionsgruppe mit GDNF-überexprimierenden SC-beschichteten Leitschienen auf ($p < 0,05$), welche sogar die Expression der Gruppe ohne Nervenschädigung (Sham) übertrifft. In der Gruppe der Tiere mit bilateraler Exzision ohne Rekonstruktion (Nervex), sowie in der Nervenrekonstruktionsgruppe konnte mit Hilfe der Quantifizierung eine signifikant verminderte nNOS-Expression im neuronalen Gewebe bestimmt werden, welche auch im Vergleich zur Rekonstruktionsgruppe mit nativen SC-beschichteten Leitschienen und der Sham-Gruppe, signifikant erniedrigt ist ($p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede bestehen zwischen Trans- und Nervex-Gruppe ($p > 0,05$).

4.1.3.2 Relative Quantifizierung der rnRNA-Expression neuronaler Marker „PGP9.5“ gegen Gewebemarker „GAPDH“

SC+GDNF- Gruppe (Gruppentiere mit arabischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	1	5	7	6
Relative RNA- Expression	0,01173481	0,00403689	0,001133603	0,00454174
PGP9.5/GAPDH	0,01229990	0,00427483	0,001048225	0,00495484
MW	0,01190741	0,00390755	0,001047275	0,00515416
SD	0,01198071	0,00407309	0,001076368	0,00488358
	0,00028959	0,00018630	4,95693E-05	0,00031237

Tab.14 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression des neuronalen Markers „PGP9.5“ gegen den Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC+GDNF-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

SC-Gruppe (Gruppentiere mit Buchstaben gekennzeichnet):

Rattename	A	B	C	D
Relative RNA- Expression	0,01305481	0,00852095	0,00415844	0,00519156
PGP9.5/GAPDH	0,01243888	0,00804544	0,00393471	0,00544451
MW	0,01330333	0,00792951	0,00373196	0,00599066
SD	0,01293234	0,00816530	0,00394171	0,00554224
	0,00044505	0,00031341	0,00021333	0,00040842

Tab.15 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression des neuronalen Markers „PG P9.5“ gegen den Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Trans-Gruppe (Gruppentiere mit römischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	I	II	III	V
Relative RNA-Expression	0,02652746	0,00419261	0,01010663	0,00803535
PGP9.5/GAPDH	0,02616092	0,00446580	0,0085336	0,00671936
	0,02241613	0,00416256	0,00874909	0,00713244
MW	0,02503484	0,00427365	0,00912978	0,00729572
SD	0,00227526	0,00016708	0,00085282	0,00067301

Tab. 16 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression des neuronalen Markers „PGP9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der Trans-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Kontroll-Gruppen:

Rattename	Sham	Nervex 1	Nervex 2	Nervex 3
Relative RNA-Expression	0,00302318	0,013170532	0	0,01543032
PGP9.5/GAPDH	0,00302024	0,012214186	0	0,01483110
	0,00355483	0,014148600	0	0,01383003
MW	0,00319942	0,013177772	0	0,01469715
SD	0,00030780	0,000967227	0	0,00080851

Tab. 17 zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression des neuronalen Markers „PGP9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus den Kontroll-Gruppen; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Optische Darstellung der relativen Quantifizierung der mRNA des neuronalen Markers „PGP9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“ (Tab.14-17):

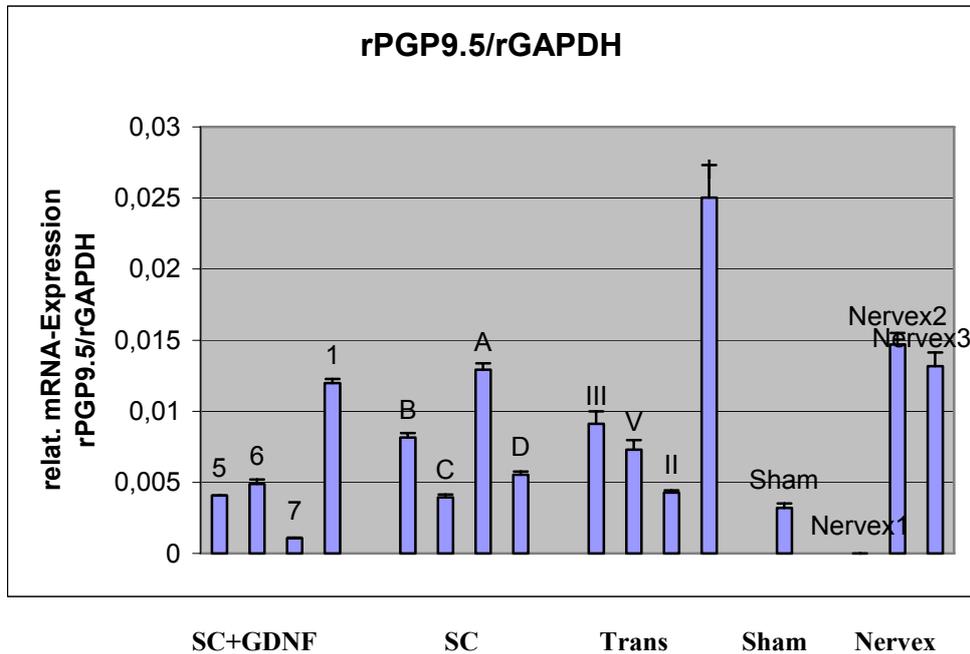


Abb. 37 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen mRNA-Expression des neuronalen Markers „PGP9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei sind die Einzeltiere nach den verschiedenen OP-Gruppen geordnet dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Versuchstiere je nach OP in verschiedene Gruppen (SC, SC+GDNF, Trans, Sham, Nervex) zusammengefasst. Indem die Mittelwerte der Gruppentiere berechnet wurden, kann man die einzelnen Gruppen miteinander vergleichen. Die Mittelwerte der Gruppen sind in Tab. 18 zu finden. Eine optische Darstellung zeigt Abb.38.

Gruppe	PGP9.5/GAPDH	
	MW	SD
SC+GDNF	0,00550344	0,00431917
SC	0,00764540	0,00393118
Trans	0,01143350	0,00928598
Sham	0,00319942	0,00030780
Nervex	0,00929164	0,00808258

Tab. 18 Mittelwerte der PGP9.5/GAPDH-Expression der verschiedenen OP-Gruppen, diese Mittelwerte wurden aus den in Tab. 14-17 aufgeführten Ergebnissen der Einzeltiere gebildet und stellen die Mittelwerte der Gesamtgruppe dar.

Optische Darstellung Mittelwerte PGP9.5/GAPDH (Tab.18) der verschiedenen OP-Gruppen:

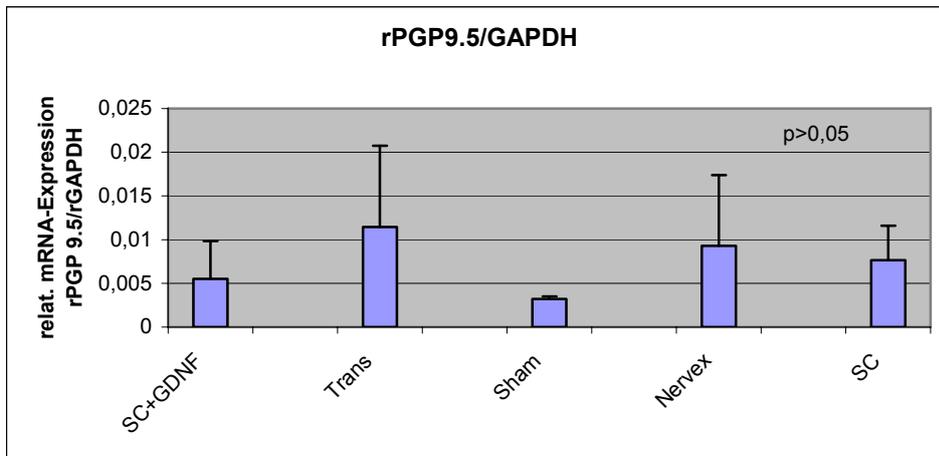


Abb. 38 Mittelwerte rel. mRNA-Expression des neuronalen Markers „ PGP9.5“ zum globalen Marker „GAPDH“ der verschiedenen OP-Gruppen. Bei der Signifikanzprüfung (4.1.5) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (p>0,05).

4.1.3.3 Relative Quantifizierung der rnRNA-Expression nNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“:

SC+GDNF- Gruppe (Gruppentiere mit arabischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	1	5	7	6
Relative RNA-Expression rnNOS/GAPDH	0,00428174 0,00472841 0,00492353	0,00418459 0,00426275 0,00385742	0,00162282 0,00164301 0,00146510	0,00258620 0,00271410 0,00293419
MW	0,00464456	0,00410159	0,00157698	0,00274483
SD	0,00032901	0,00021504	9,741E-05	0,00017602

Tab. 19 Relative Quantifizierung der RNA-Expression nNOS gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC+GDNF-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

SC-Gruppe (Gruppentiere mit Großbuchstaben gekennzeichnet):

Rattename	A	B	C	D
Relative RNA-Expression rnNOS/rGAPDH	0,00457745 0,00434252 0,00453807	0,00355891 0,00340431 0,00280563	0,002643009 0,002784021 0,002729251	0,00158396 0,00155745 0,00182145
MW	0,00448601	0,00325628	0,002718761	0,00165428
SD	0,00012582	0,00039785	7,10892E-05	0,00014538

Tab. 20 Relative Quantifizierung der RNA-Expression nNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Trans-Gruppe (Gruppentiere mit römischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	I	II	III	V
Relative RNA- Expression nNOS/GAPDH	0,00472934 0,00512905 0,00354666	0,000881793 0,000770246 0,000830218	0,00257085 0,00200964 0,00217351	0,001447859 0,001429631 0,001568726
MW	0,00446835	0,000827419	0,00225133	0,001482072
SD	0,00082285	5,58262E-05	0,00028859	7,55958E-05

Tab. 21 Relative Quantifizierung der RNA-Expression nNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der Trans-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Kontroll-Gruppen:

Rattename	Sham	Nervex 1	Nervex 2	Nervex 3
Relative RNA- Expression nNOS/GAPDH	0,00178317 0,00152899 0,00146389	0,001118902 0,001047735 0,001216631	1,55479E-05 2,2405E-05 1,91959E-05	0,001822455 0,001783476 0,001654400
MW	0,00159202	0,001127756	1,90496E-05	0,001753444
SD	0,00016871	8,47953E-05	3,43092E-06	8,79606E-05

Tab. 22 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus den Kontroll-Gruppen; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

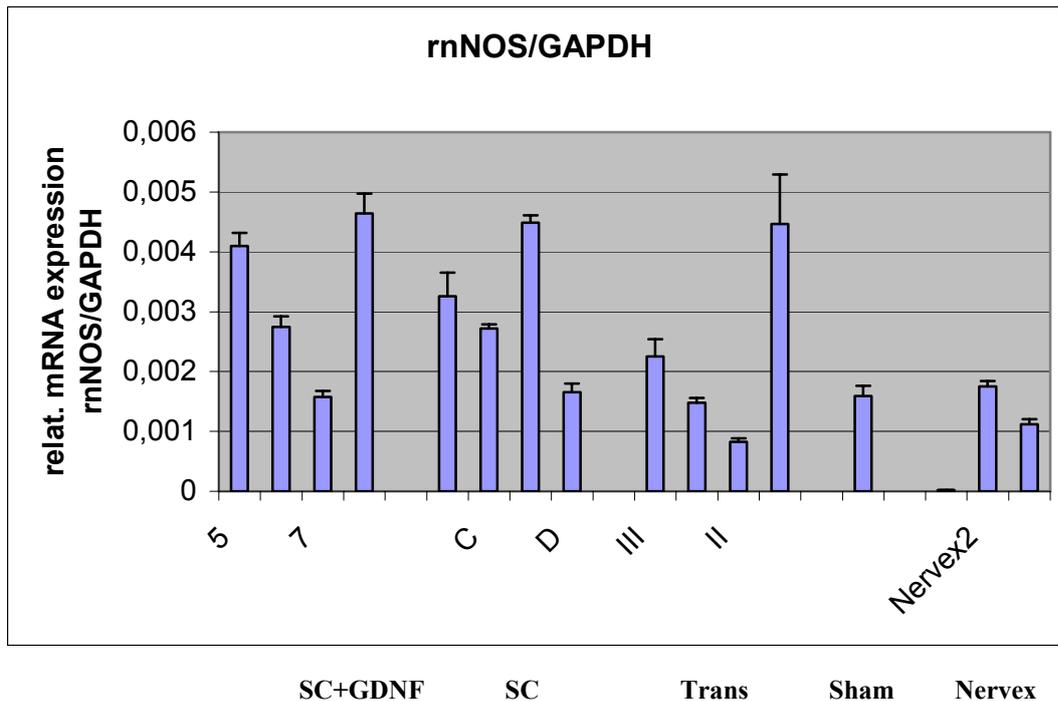


Abb. 39 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen mRNA-Expression nNOS zum globalen Gewebsmarker „GAPDH“ (Tab. 19-22); dabei sind die Einzeltiere nach den verschiedenen OP-Gruppen geordnet dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Versuchstiere je nach OP in verschiedene Gruppen (SC, SC+GDNF, Trans, Sham, Nervex) zusammengefasst. Indem die Mittelwerte der Gruppentiere berechnet wurden, kann man die einzelnen Gruppen miteinander vergleichen. Die Mittelwerte der Gruppen sind in Tab.23 zu finden. Eine optische Darstellung zeigt Abb.40.

Gruppe	nNOS/GAPDH	
	MW	SD
SC+GDNF	0,00326699	0,00138119
SC	0,00302883	0,00117766
Trans	0,00225729	0,00158475
Sham	0,00159202	0,00016871
Nervex	9,64E-04	0,00087754

Tab. 23 Mittelwerte der nNOS/GAPDH-Expression der verschiedenen OP-Gruppen. Diese Mittelwerte werden aus den in den Tab. 19-22 aufgeführten Ergebnissen der Einzeltiere gebildet und stellen die Mittelwerte der Gesamtgruppe dar.

Optische Darstellung Mittelwerte nNOS/GAPDH (Tab.23) der verschiedenen OP-Gruppen:

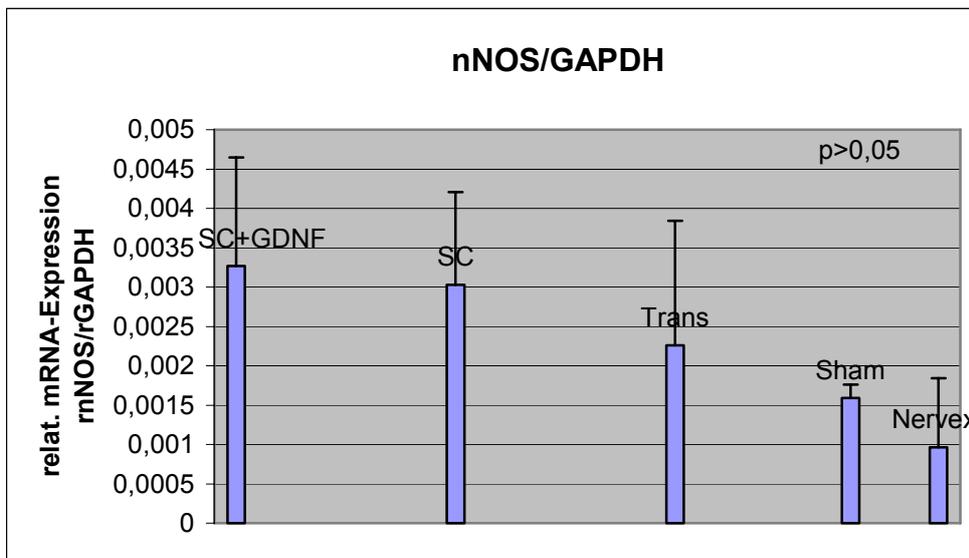


Abb. 40 Mittelwerte der rel. mRNA-Expression nNOS/GAPDH der verschiedenen OP-Gruppen. Die Abb. zeigt die Mittelwerte der nNOS-Expression zum globalen Marker „GAPDH“, die Mittelwerte wurden aus den Einzeltieren (siehe Abb.39) berechnet. Bei der Signifikanzprüfung (4.1.5) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden ($p > 0,05$).

4.1.3.4 Relative Quantifizierung der RNA Expression riNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“:

SC+GDNF-Gruppe (Gruppentiere mit arabischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	1	5	7	6
Relative RNA-Expression	4,48E-03	1,07E-03	2,84E-03	4,96E-04
riNOS/GAPDH	5,93E-03	1,21E-03	2,81E-03	5,37E-04
MW	5,98E-03	1,01E-03	2,58E-03	4,94E-04
SD	5,46E-03	1,10E-03	2,75E-03	5,09E-04
	0,85E-03	0,10E-03	0,14E-03	2,40588E-05

Tab. 24 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression iNOS gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC+GDNF-Gruppe. Es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte

SC-Gruppe (Gruppentiere mit Buchstaben gekennzeichnet):

Rattename	A	B	C	D
Relative RNA-Expression	1,59E-03	4,04E-03	1,63E-03	6,25E-04
iNOS/GAPDH	1,66E-03	3,43E-03	1,87E-03	6,58E-04
MW	1,79E-03	3,07E-03	1,62E-03	8,57E-04
SD	1,68E-03	3,51E-03	1,71E-03	7,13E-04
	0,10E-03	0,49E-03	0,15E-03	0,13E-03

Tab. 25 zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression riNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte

Trans-Gruppe (Gruppentiere mit römischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	I	II	III	V
Relative RNA-Expression	2,38E-03	8,38E-04	4,09E-03	4,92E-04
iNOS/GAPDH	2,26E-03	8,32E-04	3,40E-03	4,11E-04
	1,85E-03	7,39E-04	3,30E-03	4,73E-04
MW	2,16E-03	8,03E-04	3,59E-03	4,59E-04
SD	0,28E-03	5,52272E-05	0,42907E-03	4,24469E-05

Tab. 26 zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression iNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der Trans-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Kontroll-Gruppen:

Rattename	Sham	Nervex 1	Nervex 2	Nervex 3
Relative RNA-Expression	2,36E-04	1,98E-04	0	2,50E-03
iNOS/GAPDH	1,55E-04	1,83E-04	0	2,64E-03
	2,08E-04	2,68E-04	0	2,36E-03
MW	2,00E-04	2,16E-04	0	2,50E-03
SD	4,13079E-05	4,50172E-05	0	0,138E-03

Tab. 27 zeigt die relative Quantifizierung der RNA Expression iNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus den Kontroll-Gruppen; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte

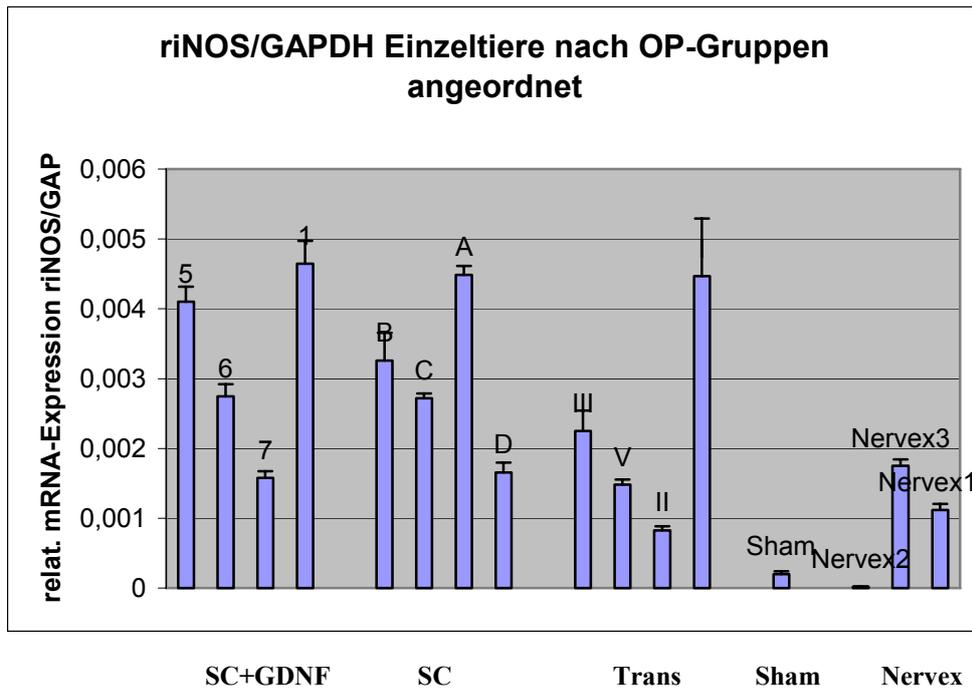


Abb. 41 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen RNA-Expression iNOS zu dem globalen Gewebsmarker GAPDH (Tab. 24-27), dabei sind die Einzeltiere nach den verschiedenen OP-Gruppen geordnet dargestellt: arabische Zahlen: SC+GDNF-Gruppe, Buchstaben: SC-Gruppe, römische Zahlen: Trans-Gruppe, Nervex-Gruppe.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Versuchstiere je nach OP in verschiedene Gruppen (SC, SC+GDNF, Trans, Sham, Nervex) zusammengefasst. Indem die Mittelwerte der Gruppentiere berechnet wurden, kann man die einzelnen Gruppen miteinander vergleichen. Die Mittelwerte der Gruppen sind in Tab.28 zu finden. Eine optische Darstellung zeigt Abb.42.

Gruppe	riNOS/GAPDH MW	SD
SC+GDNF	2,45E-03	0,002216603
SC	1,90E-03	0,00116698
Trans	1,75E-03	0,001427954
Sham	2,00E-04	4,13079E-05
Nervex	9,05E-04	0,001385238

Tab. 28 Mittelwerte der iNOS/GAPDH-Expression der verschiedenen OP-Gruppen. Diese Mittelwerte werden aus den in den Tab. 24-27 aufgeführten Ergebnissen der Einzeltiere gebildet und stellen die Mittelwerte der Gesamtgruppe dar.

Optische Darstellung Mittelwerte iNOS/GAPDH (Tab.28) der verschiedenen OP-Gruppen:

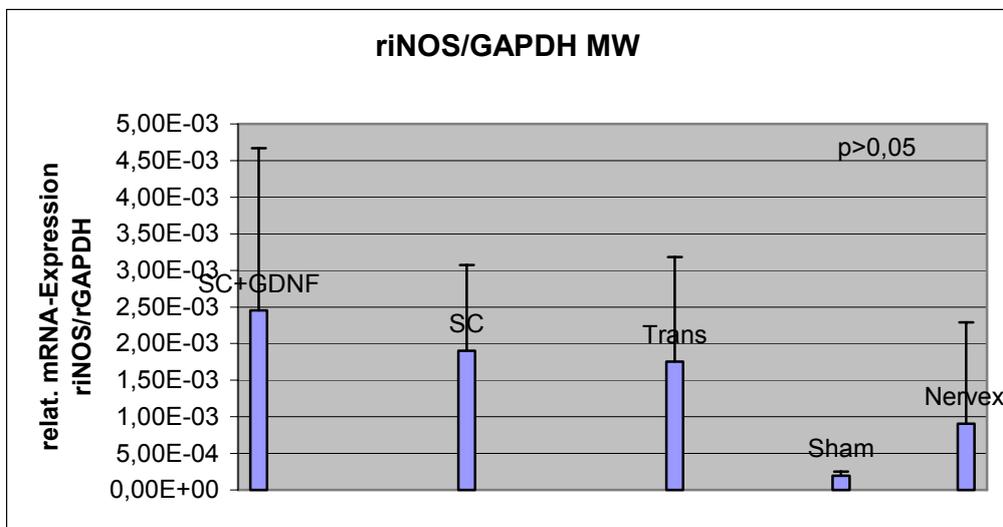


Abb. 42 Mittelwerte der rel. RNA-Expression riNOS/GAPDH der verschiedenen OP-Gruppen. Die Abb. zeigt die Mittelwerte der iNOS-Expression zum globalen Marker „GAPDH“, die Mittelwerte wurden aus den Einzeltieren (siehe Abb.41) berechnet. Bei der Signifikanzprüfung (4.1.5) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden ($p > 0,05$).

4.1.3.5 Relative Quantifizierung der RNA Expression reNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“:

SC+GDNF- Gruppe (Gruppentiere mit arabischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	1	5	7	6
Relative RNA-Expression	0,00808790	0,00343622	0,00424618	0,00402257
eNOS/GAPDH	0,00895622	0,00362839	0,00416093	0,00396816
	0,00871309	0,00336435	0,00356249	0,00425476
MW	0,00858574	0,00347632	0,00398987	0,00408183
SD	0,00044795	0,00013651	0,00037257	0,00015221

Tab.29 Relative Quantifizierung der RNA-Expression eNOS gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC+GDNF-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

SC-Gruppe (Gruppentiere mit Buchstaben gekennzeichnet):

Rattename	A	B	C	D
Relative RNA-Expression	0,00564548	0,00254226	0,00671655	0,00672867
eNOS/GAPDH	0,00536333	0,00250331	0,00628126	0,00673225
	0,00581879	0,00215967	0,00611903	0,00758311
MW	0,00560920	0,00240175	0,00637228	0,00701467
SD	0,00022989	0,00021054	0,00030898	0,00049228

Tab. 30 Relative Quantifizierung der RNA-Expression eNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Trans-Gruppe (Gruppentiere mit römischen Zahlen gekennzeichnet):

Rattename	I	II	III	V
Relative RNA-Expression	0,00895052	0,00591883	0,00848637	0,00788719
eNOS/GAPDH	0,00986514	0,00699485	0,00642191	0,00788121
	0,00798713	0,00642331	0,00677271	0,00788121
MW	0,00893426	0,00644566	0,00722699	0,007886784
SD	0,00093911	0,00053836	0,00110466	5,38322E-06

Tab. 31 Relative Quantifizierung der RNA-Expression eNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der Trans-Gruppe; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

Kontroll-Gruppen:

Rattename	SHAM	Nervex 1	Nervex 2	Nervex 3
Relative RNA-Expression	0,01038851	0,008846532	0,01629906	0,00927479
eNOS/GAPDH	0,00979903	0,007502993	0,01447333	0,00850340
	0,00873866	0,008684801	0,01210582	0,00803559
MW	0,00964207	0,008344775	0,01429274	0,00860459
SD	0,00083605	0,000733476	0,00210244	0,00062577

Tab. 32 Relative Quantifizierung der RNA-Expression eNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus den Kontroll-Gruppen; es erfolgten bei jedem Tier drei getrennte Quantifizierungen um Messfehler zu minimieren (siehe zweite Zeile), aus denen der Mittelwert (siehe dritte Zeile) und die Standardabweichung (siehe vierte Zeile) ermittelt werden konnte.

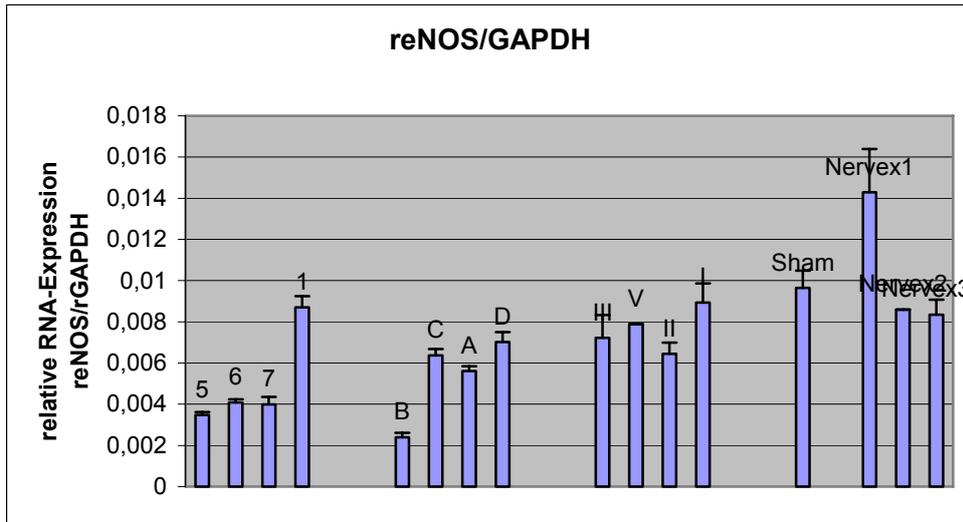


Abb. 43 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen RNA-Expression reNOS zum globalen Gewebsmarker „GAPDH“ (Tab. 29-32), dabei sind die Einzeltiere nach den verschiedenen OP-Gruppen geordnet dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Versuchstiere je nach OP in verschiedene Gruppen (SC, SC+GDNF, Trans, Sham, Nervex) zusammengefasst. Indem die Mittelwerte der Gruppentiere berechnet wurden, kann man die einzelnen Gruppen miteinander vergleichen. Die Mittelwerte der Gruppen sind in Tab.33 zu finden. Eine optische Darstellung zeigt Abb.44.

Gruppe	reNOS/GAPDH	
	MW	SD
SC+GDNF	0,00506528	0,00244643
SC	0,00534948	0,0020474
Trans	0,00762342	0,00105387
Sham	0,00964207	0,00083605
Nervex	0,01041404	0,00336157

Tab. 33 zeigt die Mittelwerte der eNOS/GAPDH-Expression der verschiedenen OP-Gruppen, diese Mittelwerte werden aus den in den Tab. 29-32 aufgeführten Ergebnissen der Einzeltiere gebildet und stellen die Mittelwerte der Gesamtgruppe dar.

Optische Darstellung Mittelwerte eNOS/GAPDH (Tab.33) der verschiedenen OP-Gruppen:

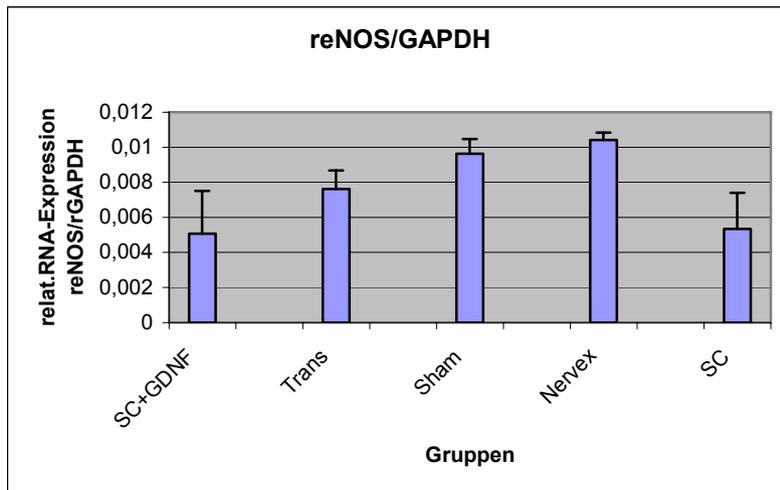


Abb. 44 Mittelwerte der rel. mRNA-Expression eNOS/GAPDH der verschiedenen OP-Gruppen. Die Abb. zeigt die Mittelwerte der eNOS-Expression zum globalen Marker „GAPDH“, die Mittelwerte wurden aus den Einzeltieren (siehe Abb.43) berechnet. Bei der Signifikanzprüfung (4.1.5) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen SC+GDNF- und Nervex-Gruppe berechnet werden, weitere signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich nicht ($p > 0,05$).

4.1.3.6 Ermittelte Beziehung zwischen intrakavernösem Maximaldruck (nach elektrischer Stimulation der kavernösen Nerven) und des durch relative Quantifizierung

**bestimmten
Verhältnisses
der Expression
von
nNOS/PGP9.5**

GRUPPE	RattenNr.	nNOS/PGP	Kav.Max.P.	Kav.Basisdruck
GDNF	7	1,46598	58	16
	1	0,38759	63	17
	6	0,56216	42	9
	5	1,00697	49	9
SC	D	0,2984	42	11
	A	0,3469546	44	8
	B	0,398082	87	47
	C	0,697489	88	28
Trans	III	0,2461	33	10
	V	0,20429	49	18

Tab. 34 Gegenüberstellung von durch relat. Quantifizierung gewonnenem nNOS/PGP9.5 Expressionsverhältnis und intrakavernösem Maximaldruck [mmHg] nach elektrischer Stimulation der kavernösen Nerven bzw. intrakavernösem Basisdruck [mmHg] (ohne Stimulation).

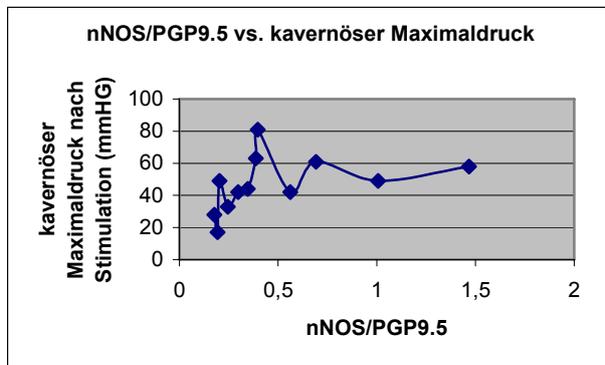


Abb. 45 Optische Darstellung der experimentell ermittelten Beziehung zwischen intrakavernösem Maximaldruck (nach elektrischer Stimulation der kavernösen Nerven) und des durch relative Quantifizierung bestimmten Verhältnisses der Expression von nNOS/PGP9.5. Hierbei kann anhand des Diagramms eine Proportionalität zwischen nNOS-Expression und kavernösem Maximaldruck vermutet werden. Keine statistische Signifikanzprüfung.

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei keinem der Tiere aus der Nervex-Gruppe konnte nach einer sechs-wöchigen Latenzzeit nach Nervenexplantation mit Hilfe elektrischer Stimulation eine optisch feststellbare Erektion erreicht werden.

Auch bei der Nervex-Gruppe erfolgten Präparationen des Schwellkörpers mit anschließender relativer Quantifizierung der NOS-Isoformen. Im Gegensatz zur Sham-Gruppe zeigte sich bei den Tieren mit durchtrennten Nervenfasern eine signifikant erniedrigte nNOS-Konzentration im Verhältnis zum neuronalen Marker „PGP 9.5“. Hier konnten bei der statistischen Auswertung signifikante Unterschiede zu den Rekonstruktionsgruppen (SC, SC+GDNF) berechnet werden (siehe 4.1.5). Die Expression der nNOS im Verhältnis zum neuronalen Gewebe war hier am geringsten auch im Vergleich zu den Gruppen mit versuchter Rekonstruktion.

Bei den Nervenrekonstruktionsgruppen d.h. bei den Gruppen SC, SC+GDNF und der Gruppe mit der autologen Nervenreplantation (Trans) erfolgte eine Auswertung simultan.

Bei der optischen Funktionskontrolle konnten bei beiden Gruppen mit artefiziellen Leitlinien (SC, GDNF) eine optische Erektionshäufigkeit von 78% festgestellt werden.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten bei den Tieren mit autologer Nerven transplantation nur eine Erfolgsquote von 42% erreicht werden.

Bei der kavernösen Druckmessung wurden die höchsten Werte mit einer durchschnittlichen Druckerhöhung von 33,5 mmHg bei den Tieren der Gruppe SC+GDNF gemessen. Die Druckerhöhung bei den Tieren der SC-Gruppe erreichte mit 27,5 mmHg mittlerem Druckanstieg nicht wesentlich niedrigere Werte. Der durchschnittliche Druckanstieg bei der Nerven transplantationsgruppe stellt mit 8,2 mmHg einen wesentlich geringeren Anstieg des kavernösen Druckes dar. Die optischen Ergebnisse korrelieren damit gut mit den kavernösen Druckanstiegen. Dabei können im Schwellkörper Druckanstiege verzeichnet werden, die für eine optische erkennbare Erektion noch nicht ausreichend waren.

Bei der relativen Quantifizierung der neuronalen NOS im Verhältnis zum neuronalen Gewebemarker PGP9.5 stellten sich für die SC+GDNF Gruppe die höchsten Werte mit circa 0,8 ein. Die Werte liegen hier sogar über den Werten für die Sham-Gruppe (ca. 0,6), welche intakte Nerven aufweist. Die SC-Gruppe weist im Vergleich ein mittleres Verhältnis von ca. 0,4 auf. Bei der Nerven transplantationsgruppe kann ein Verhältnis zum neuronalen Marker von ca. 0,2 bestimmt werden. Hierbei wurden signifikante Unterschiede (Erhöhungen) für die Gruppe mit SC+GDNF gegenüber der Nerven transplantations- und der Nervenexzisionsgruppe, jedoch nicht gegenüber der SC-Gruppe durch einen ANOVA Test festgestellt (4.1.5).

Die gefundene nNOS-Expression korreliert auch hier mit den funktionellen Tests. Bei Tieren mit einem hohen Anteil der nNOS konnten bei der elektrischen Stimulation höhere Druckanstiege gemessen werden (siehe Abb. 45).

Zusammenfassend wurden bei unseren Untersuchungen durch die NOS Quantifizierung signifikante Unterschiede der nNOS im neuronalen Gewebe (nNOS/PGP9.5) in den verschiedenen Gruppen gefunden. Hierbei fanden sich hohe Konzentrationen der nNOS bei den beiden Gruppen mit artefiziellen mit SC angereicherten bzw. mit GDNF überexprimierenden SC angereicherten Leitschienen. Signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen konnten jedoch nicht festgestellt werden. Eine zu den beiden Gruppen mit artefiziellen Leitschienen signifikant niedrigere nNOS-Expression wurde dagegen in der Gruppe mit der autologen Nerven transplantation bestimmt. Diese Gruppe zeigte auch deutlich schlechtere funktionelle Tests und erniedrigte intrakavernöse Drücke im Vergleich. Die nNOS-Quantifizierung korreliert hierbei gut mit den funktionellen Tests, sowie mit den intrakavernösen Druckmessungen.

Bei der Quantifizierung der iNOS bzw. eNOS konnten zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden

4.1.5 Signifikanzprüfung

Die Signifikanzprüfung erfolgte dankenswerterweise durch Frau Dipl.-Math. Raymonde Busch, Institut für Statistik Klinikum rechts der Isar, TU-München. Die Ergebnisse sind in den betreffenden Tabellen wiedergegeben.

4.1.6 Histologische Ergebnisse der Nervenregenerate

Die histologische Auswertung der während dieser Arbeit gewonnenen Präparate erfolgt im Rahmen einer ebenfalls durch die Urologische Klinik des Klinikum rechts der Isar vergebenen Approbationsarbeit. Sie wird durch Herrn cand. med. Christian Arndt durchgeführt.

In Abb. 46 soll ein Beispiel eines Nervenregenerats mit Silikonröhrchen im Querschnitt demonstriert werden.

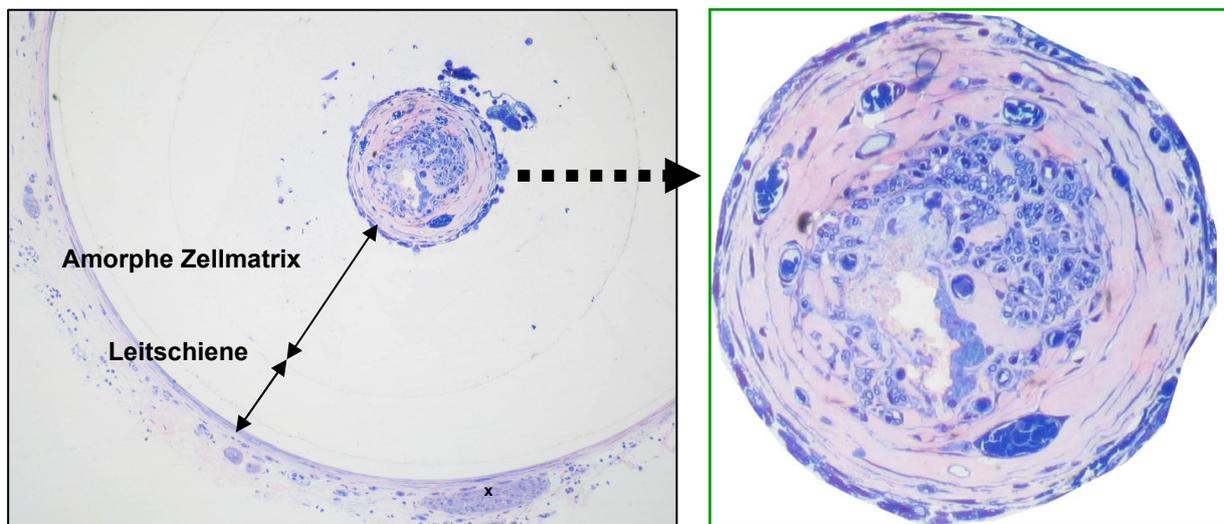
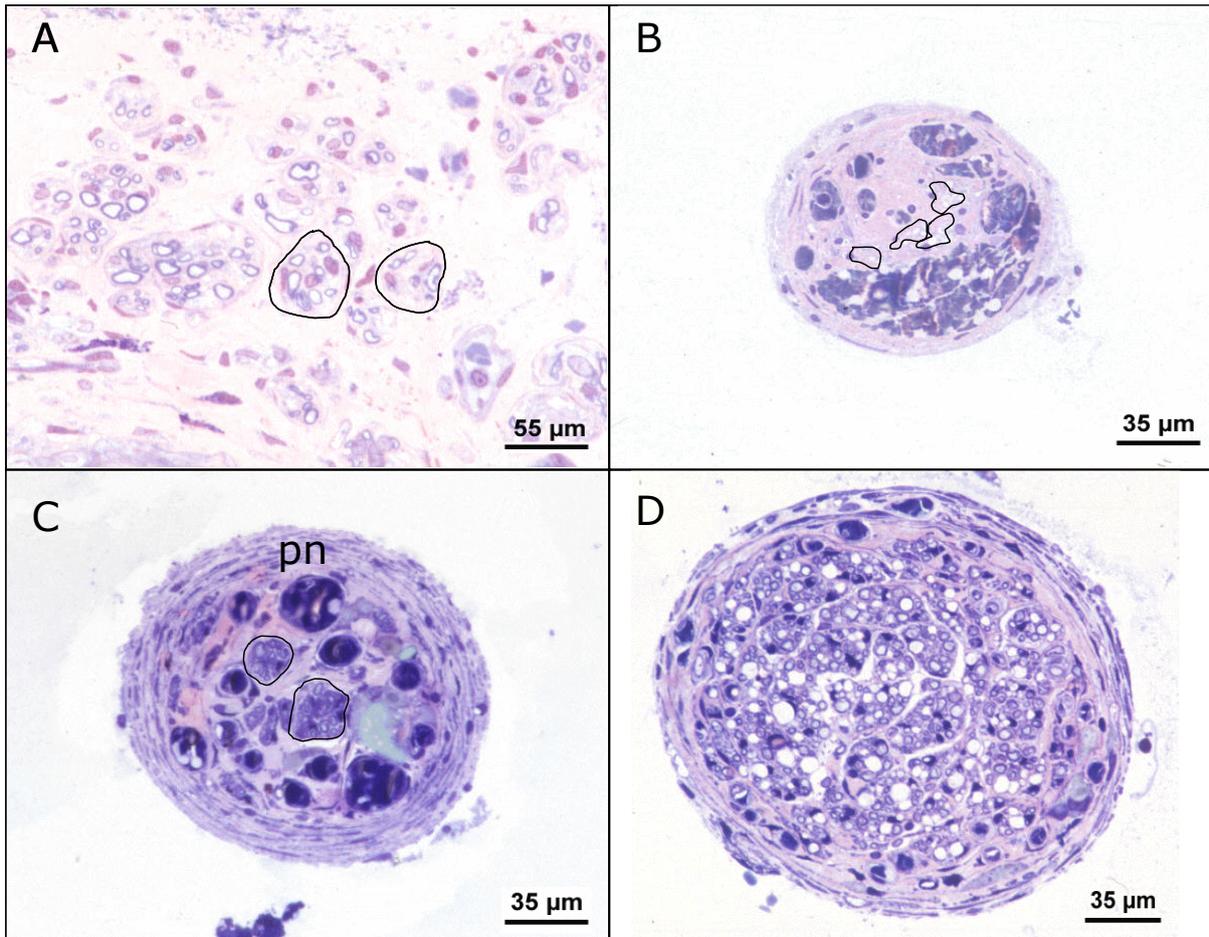


Abb. 46 Beispiel für den Querschnitt eines Nervenregenerats mit Leitschiene (Silikonröhrchen). Werden die Nervenleitschienen bei der Färbung belassen, kommt die amorphe gelatineartige Zellsubstanz zur Darstellung, die den Raum zwischen dem Regenerat und der Leitschiene ausfüllt. Auch außerhalb der Leitschiene sind vereinzelt Nervenfaserbündel nachweisbar.

Die Anwendung von Silikon-Nervenleitschienen gefüllt mit SC zur Rekonstruktion der erektilen Nerven am Tiermodell der Ratte führt, wie auch bei dieser Arbeit bestätigt werden konnte, zur besseren strukturellen (siehe Abb.47) und funktionellen Wiederherstellung (siehe Tab.4) Dabei wurden die kavernenösen Nerven beidseits durchtrennt und Silikon-Leitschiene gefüllt mit primären SC interponiert (Abb.46). Mit dieser Methode konnte eine nahezu vollständige Wiederherstellung der erektilen Funktion (78% der Fälle) erzielt werden (siehe Tab.4). Im Vergleich dazu, führten Nerv-Autotransplantate nur in 42% der Fälle zur funktionellen Erholung.



Vergleich der Verfahren:

Abb. 47 Lichtmikroskopische Präparate (Azur-Safranin-Färbung)

- (A) In Nerventransplantaten sind vereinzelt Minifaszikel (Markierung) nachweisbar, die von einer einzelnen Schicht Perineuralzellen umgeben sind. Es zeigt sich viel undifferenziertes Bindegewebe und eine kompakte Nervenstruktur ist nicht zu erkennen.
- (B-D) Die Nervenregenerate in Leitschienen haben dagegen einen runden und kompakten Aufbau. Die Nervenleitschienen wurden vor der Färbung entfernt und sind deshalb nicht abgebildet. Trotz gleichem Innendurchmesser der Leitschienen zeigt sich ein deutlich zunehmender Durchmesser der Nervenregenerate von Bild B (initial leere Leitschienen) über Bild C (Leitschienen mit SC) hin zu Bild (D) (Leitschienen mit GDNF-transduzierten SC). Dies ist durch die bei der Nervenregeneration entstehende amorphe gelatineartige Zellsubstanz zu erklären, die den verbleibenden Raum zwischen Nervenregenerat und Leitschiene ausfüllt und bei der Färbung herausgelöst wird. (B) Regenerate in initial leeren Leitschienen bestehen aus viel undifferenziertem Bindegewebe, kavernösen Blutgefäßen und nur im Zentrum sind vereinzelt überwiegend unmyelinisierte Nervenfasern (Markierung) nachweisbar.
- (C) In Leitschienen mit Schwannschen Zellen zeigt sich dagegen ein strukturierter Aufbau mit größeren und überwiegend myelinisierten Faserbündeln (Markierung), die von einem mehrschichtigem Perineurium (pn) umgeben sind.
- (D) Leitschienen mit GDNF-transduzierten Schwannschen Zellen bestehen nahezu vollständig aus relativ großen und überwiegend myelinisierten Faserbündeln, die von einem mehrschichtigen Perineurium (pn) umgeben sind.

5. Diskussion

5.1 Einleitung

In Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass Silikonleitschienen mit SC bei der Rekonstruktion erektiler Nerven eine deutlich höhere Erfolgsrate erzielen, als autologe Nerventransplantate oder leere Leitschienen, und dass GDNF-überexprimierende SC die Nervenregeneration beschleunigen. Um die funktionellen Ergebnisse der Vorarbeiten zu bestätigen, bzw. zu vertiefen und in die Klinik zu übertragen, soll diese Arbeit die Rolle von NO beim Erektionsvorgang selbst, sowie bei den Regenerationsprozessen am geschädigten peripheren Nerven näher beleuchten.

Hierzu erfolgten Versuche an der Ratte, welche aufgrund ihrer anatomischen Ähnlichkeit ein hervorragendes Vergleichsmodell zum Menschen darstellt.

Auf der einen Seite wurde beim praktischen Teil dieser Arbeit die herkömmliche Methode der Nerventransplantation, bei der mit Teilen des N. genitofemoralis ein 5 mm großer Nervendefekt des kavernösen Nervens überbrückt werden soll, angewandt. Auf der anderen Seite wurde mit Hilfe artefizieller Leitschienen versucht, das Wachstum des organischen Nervens positiv zu beeinflussen und damit die Nervenkontinuität wiederherzustellen.

Hierbei wurden mit nativen SC, als auch mit genetisch veränderten SC, welche GDNF überexprimieren, gefüllte Silikonröhrchen verwandt. Zusätzlich wurden mehrere Kontrollgruppen zur Sicherung der Validität der Studie gehalten.

Bei den Gruppen erfolgten optische, funktionelle und histologische Auswertungen; des Weiteren wurden bei einigen der untersuchten Tiere Teile des Corpus cavernosum freipräpariert, entnommen und mit Hilfe einer quantitativen Real-time Reverse Transkriptase PCR die relative NOS-Isomerasen-Konzentration gegenüber spezifischen Gewebemarkern bestimmt. Der NOS, welche NO synthetisiert, kommt bei der Erektion eine bedeutende Rolle zu. Der Schwerpunkt dieser Arbeit konzentriert sich auf dieses Enzym. Hierbei sollte weiterhin eine Differenzierung in die verschiedenen NOS-Isomerasen erfolgen und NOS-Expressionsänderungen mit der jeweiligen Rekonstruktionsform in Beziehung gesetzt werden. Zusammenfassend wurde also untersucht, wie verschiedene rekonstruktive Maßnahmen, beziehungsweise wie sich das Vorhandensein von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf das mikroskopische Bild des Nervens, auf die erektile Funktionalität und auf molekularer Ebene auf die quantitative Expression der NOS-Isoformen auswirkt. Durch die gewonnenen Ergebnisse soll ermittelt werden, welche Rekonstruktionsmethode von größtem Vorteil ist

und wie sich Mediatoren, in unserem Fall NO, dem eine Schlüsselrolle im Erektionsvorgang sowie im regenerativen Prozess zukommt, auf molekularer Ebene verhalten. Dies könnte weitere Therapieoptionen eröffnen.

Insbesondere liegt unser Interesse bei Nervenschädigungen der erektilen Nerven, die sehr häufig bei der radikalen Prostatovesikulektomie vorkommen. Eine Schädigung der Nn. erigentes hat oft fatale Folgen für die erektile Funktion. Da sich in den letzten Jahren, durch immer besser werdende Chirurgie die Prognose bei malignen Prostatatumoren deutlich gebessert hat und immer längere Überlebenszeiten erreicht werden, tritt die postoperative Lebensqualität immer mehr in den Vordergrund. So liegt vermehrt Interesse an einer Verbesserung der Lebensqualität durch Erhalt der Potenz, sowie eine Reduktion der Inkontinenz postoperativ.

Durch die gewonnenen Ergebnisse sollen somit auch bei Männern, die Nervendefekte erektiler Nervenfasern aufweisen, wie zum Beispiel bei der radikalen Prostatovesikulektomie, die beste Möglichkeit einer Rekonstruktion ermittelt und neue Strategien entwickelt werden.

5.2 Ergebnisse

NO spielt zum einen eine entscheidende Rolle im Rahmen des Erektionsmechanismus, zum anderen hat es bedeutende Einflüsse auf die neuronale Regeneration.

In unseren Versuchen zeigte sich, dass das Vorhandensein der nNOS signifikant mit der erfolgreichen Nervenregeneration korreliert. Es erfolgten Präparationen des Schwellkörpers mit anschließender relativer Quantifizierung der NOS-Isoformen. Dabei fiel auf, dass sich bei der Nervex-Gruppe, der Gruppe bei der eine bilaterale Exzision mit Kontinuitätsunterbrechung der Nn. erigentes erfolgte, im Gegensatz zu nativen Tieren (Sham-Gruppe) eine signifikant erniedrigte nNOS-Konzentration im neuronalen Gewebe zeigte. Weiterhin fiel ein deutlich erniedrigtes Vorkommen nNOS-haltigen Nervengewebes in der Nervenrekonstruktionsgruppe auf. In den Rekonstruktionsgruppen (SC, SC+GDNF) konnte hingegen eine deutlich höhere nNOS-Expression nachgewiesen werden, welche z.T. die Expression nativer Ratten (Sham) ohne Nervenläsion übertraf. Die funktionellen und histologischen Ergebnisse korrelierten hierbei mit der Höhe der nNOS-Expression. Die nNOS hat sich auch schon in vorausgehenden Arbeiten als die entscheidende Isoform beim Erhalt der erektilen Funktion hervorgehoben. Ist die Konzentration von nNOS stark vermindert, kommt es zur erektilen Dysfunktion (Burnett AL, 2004). Selbst eine unterstützende medikamentöse Therapie mit Phosphodiesterasehemmern erbrachte bei ungenügend hoher

Konzentration an nNOS keine entscheidend bessere erektile Funktion. Bei Tieren mit erniedrigtem Vorkommen der nNOS wurden unter elektrischer Stimulation der kavernösen Nerven erniedrigte Druckanstiege im Schwellkörper im Vergleich zu nativen Mäusen mit natürlicher nNOS-Konzentration gemessen. Die verminderte Ausprägung der eNOS brachte dagegen keine signifikant reduzierten intrakavernösen Druckanstiege gegenüber Wildmäusen (Cashen DE, 2002). In Bezug auf die zwei anderen NOS-Isoformen konnten auch in unserer Arbeit keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden.

Somit kann eine Korrelation zwischen intrakavernösem Druck und nNOS-Vorkommen vermutet werden. Auch die Ergebnisse unserer Arbeit lassen eine Proportionalität dieser beiden Faktoren vermuten. In Abb. 45 sind unsere Ergebnisse diesbezüglich optisch dargestellt. Ähnliche Zusammenhänge konnten ebenfalls bei einer Studie von El-Sakka et al festgestellt werden. Der Abfall bzw. Anstieg der nNOS-haltigen Fasern im zeitlichen Verlauf nach unilateraler Kryoablation eines kavernösen Nervens bei der Ratte korrelierte mit dem bei der Studie durch Elektrostimulation provozierten Druckanstieg im Corpus cavernosum (El-Sakka A, 1998). El-Sakka konnte weiterhin in Versuchen zeigen, dass es bei unilateraler Kryoablation erektiler Nerven im zeitlichen Verlauf im Anfangsstadium zu einer Reduzierung der nNOS-haltigen Fasern auf der ablatierten Seite kommt. Im Verlauf konnte jedoch festgestellt werden, dass einige Wochen nach Ablation der Anteil nNOS-positiver Fasern auch auf der geschädigten Seite wieder zunahm. Gleichzeitig war ein Anstieg des intrakavernösen Drucks nach Elektrostimulation zu verzeichnen. El-Sakka nimmt an, dass im zeitlichen Verlauf eine Wiederherstellung der Axonkontinuität erfolgt sein muss. Die kryoablatierten kavernösen Nerven könnten dabei als Leitschienen für vom proximalen Nervenstumpf neu aussprossenden Axone dienen. Dies könnte das, im Vergleich zu Ratten, welche eine Nervenexzision erhalten, verbesserte Wiedererlangen der erektilen Funktion auf der geschädigten Seite erklären.

Insgesamt lassen unsere und vorausgehende Versuche vermuten, dass bei erfolgreicher, zeitnaher Wiederherstellung der axonalen Kontinuität mit Reinnervation des Schwellkörpergewebes ein Wiederanstieg der nNOS-Expression im neuronalen Gewebe zu erwarten ist. Hierdurch kann zu einer verbesserten Regeneration mit Wiedererlangen der Erektionsfähigkeit kommen.

Eine zeitnahe Wiederherstellung der axonalen Kontinuität ist, wie in unserer Studie auch histologisch gezeigt werden kann, mit Hilfe des „tissue engineering“ sehr viel schneller zu erreichen, als bisherige Rekonstruktionsversuche welche Nerventransplantate einsetzten. Wichtig für eine erfolgreiche Regeneration scheint hierbei die nNOS-Expression zu sein.

Eine drastische Erniedrigung führt zu einer verminderten Regenerationsfähigkeit. In vorausgehenden Studien wurde bei Tieren mit artefiziell verminderter nNOS-Expression nach Nervendurchtrennung des N. ischiadicus mit anschließender Fadenadaption eine Verlangsamung der Nervenregeneration festgestellt. Es kam vermehrt zu unkoordiniertem Wachstum, einer verspäteten Waller-Degeneration (siehe 2.3.2) und einer verzögerten Erholung der sensiblen und motorischen Funktion. Weiterhin wurde ein substantieller Verlust der Dorsalwurzeln, der Rückenmarkinterneurone und der Motoneurone festgestellt. Artefizielle Änderungen der eNOS bzw. iNOS wurden im Vergleich gut toleriert, und es konnten keine signifikanten Unterschiede zu nativen Mäusen festgestellt werden (Keilhoff, 2002). Diese Ergebnisse Keilhoffs stimmen mit unseren Messungen überein. Histologisch zeigten sich unter „ausreichender“ nNOS-Expression deutlich fortgeschrittene Nervenregenerate. Die im Penis enthaltenen Nervenfasern können sympathischen, parasympathischen oder sensiblen Ursprungs sein. Damit kann der Nachweis einer Präsenz von unspezifischem Nervengewebe keinen exakten Ausschluss über einen intakten Erektionsweg geben. Die Fähigkeit NOS-haltige Nervenfasern zu erkennen und zu quantifizieren bietet somit einen guten Weg die Integrität und Regeneration eines erektilen Nervens darzustellen.

Die nNOS scheint für den Erhalt der erektilen Funktion essentiell. Einhergehend mit erniedrigtem nNOS-Vorkommen konnte bei 100% der Tiere mit bilateraler Nervenexzision ohne Rekonstruktion eine aufgehobene Erektionsfähigkeit beobachtet werden. Die Exzision führte demnach zu einer so hochgradigen Schädigung, dass intrinsische Reperaturmechanismen nicht ausreichten, um die Nervenkontinuität und damit die erektile Funktion ohne rekonstruktive Maßnahmen wiederherzustellen. Die Ergebnisse dieser Studien korrelieren mit den Erfahrungen, die man bei der radikalen Prostatovesikulektomie gemacht hat. Bei vielen Patienten mit unilateraler Nervenschädigung - d.h. mindestens ein neurovaskuläres Bündel wurde bei der Operation erhalten - kommt es anfänglich zur totalen erektilen Dysfunktion. Bei den meisten Patienten, die eine nervenschonende Therapie erhielten, zeigt sich dann aber im Verlauf eine langsame Rehabilitation der erektilen Funktion. Dies kann oft 6-18 Monate in Anspruch nehmen. Bei Patienten, bei denen zum Beispiel aus onkologischen Gründen eine bilaterale Exzision erfolgte, ist hingegen auch nach Monaten keine erektile Funktion zu erwarten (Lue TF, 2001).

Ein weiteres Problem, welches eine zeitnahe Wiederherstellung der axonalen Kontinuität, bzw. das Vorhandensein apoptosehemmender Substanzen voraussetzt, stellt die irreversible Atrophie des Schwellkörpergewebes dar. Dies wirft die Frage eines Zusammenhanges

zwischen nNOS-Konzentration im Gewebe und atrophischen Prozessen im Corpus cavernosum auf. In Studien zeigte sich ein protektiver Effekt von NO auf geschädigte Nervenfasern (Thippeswamy T, 1997) und eine starke Auswirkung sowohl auf die Nervenregeneration (Cristino L, 2000) als auch auf die Apoptose von Nervenzellen (Heneka M.T., 1998). NO kann somit Apoptose induzieren als auch inhibieren (Chung HT, 2001).

NO stellt somit einen wichtigen Mediator im Regenerationsprozess dar. Durch eine Steuerung der Apoptose kann NO regulatorische Aufgaben bei der gezielten Nervenregeneration übernehmen. Unkoordiniert wachsende Nervenfasern können durch Apoptoseinduktion eliminiert werden, während Axone, welche ihre zugehörig distale SC ansteuern, durch Apoptoseinhibition geschützt werden können (Brushart TM, 1993; Van Wangenen S, 2001).

Bei einer Studie nach Ernst (2000) konnte gezeigt werden, dass NO bei der Elimination fehlgeleiteter Axone beteiligt ist. Eine Studie nach Van Wangenen und Rehder (2001) zeigte dagegen eine wachstumsgenerierende und nervenerhaltende Wirkung von NO bei der Findung der korrekten Nervenverbindungen (path finding). In unseren Quantifizierungen konnten zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in Hinsicht auf NOS-Expression nur bei der nNOS gefunden werden. Die restlichen NOS-Isoformen unterschieden sich trotz histologisch unterschiedlichen Ergebnissen in ihrer quantitativen Expression nicht signifikant. Dies konnte auch in neueren Studien festgestellt werden. So zeigte eine Studie nach Keilhoff, 2002, dass sich die Regeneration peripherer Nerven bei unterschiedlichem Vorhandensein der NOS-Isoformen deutlich unterschied. Das Fehlen der neuronalen NOS verursachte eine bei Weitem schlechtere und verlangsamte Regeneration als das Fehlen einer anderen NOS-Isoform.

Dies konnte anhand experimenteller Untersuchungen an Mäusen gezeigt werden. Die Up-Regulation der nNOS-Expression stellt somit vermutlich eine lokale Reaktion dar, welche mit der Regeneration assoziiert ist. Bei der Rekonstruktionsgruppe, bei der GDNF-überexprimierende SC verwandt wurden, zeigte sich eine nNOS-Expression, welche die der nativen Tiere quantitativ übertraf. Gleichzeitig konnten bei dieser Gruppe sehr gute histologische und funktionelle Ergebnisse erreicht werden.

Zusammenfassend läßt sich folgern, dass der nNOS eine bedeutsame Rolle im Prozess der Regeneration zukommt. Zum einen können atrophische Prozesse verhindert werden, zum anderen erfolgt eine gezielte Wiederherstellung der Axonkontinuität. Wir wissen allerdings nicht, ob die nNOS einen Teil der Sequenz in diesem Prozess darstellt oder dessen Initiator ist. NOS negative Fasern könnten Nervenfasern mit einer gestörten Transkription bzw. Translation darstellen, welche aufgrund eines Nervendefekts vermindert NOS produzieren.

Rekonstruktionsgruppen:

Bei den Rekonstruktionsgruppen, bei denen mit Hilfe von tissue-engineering versucht wurde das Nervenwachstum gezielt zu beeinflussen, konnten neben besserer Funktionalität auch signifikant höhere nNOS-Expressionen nachgewiesen werden. Bei der Gruppe mit GDNF überexprimierenden SC konnte sogar im Vergleich zu nativen Ratten (Sham) eine Überexpression von nNOS ermittelt werden. In unseren Untersuchungen konnten keine signifikanten Veränderungen der zwei anderen NOS-Isomerasen (iNOS, eNOS) zwischen den verschiedenen Rekonstruktionsgruppen festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die entscheidende Bedeutung der nNOS.

Der Einsatz artefizieller Leitschienen in Kombination mit neurotrophen Faktoren scheint vielversprechend und ist nach den Ergebnissen unserer Arbeit mit hohen Erfolgsquoten verbunden. Die Überlegenheit gegenüber der autologen Nerventransplantation lassen sich anhand folgender Erklärungsansätze begründen:

Zum einen kann durch den Einsatz artefizieller Leitschienen ein zielorientiertes Wachstum der Nervenfasern erreicht werden. In Voruntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass selbst unbeschichtete Silikonröhrchen zu einer signifikant höheren Funktionsrate als autologe Nerventransplantate führten (May F, 2004). Bei hochgradigen Nervendefekten mit Neurotmesis, d.h. Durchtrennung der Nervenfasern und axonalen Hüllstrukturen, ist der Einsatz von artefiziellen Leitschienen, welche zielgerichtetes Wachstum ermöglichen, Nerventransplantaten deutlich überlegen. Die Interposition autologer Nerventransplantate kann zwar prinzipiell als solide Leitschiene einer Regeneration dienen, jedoch zeigte sich in unseren histologischen Ergebnissen, dass regenerierende Axone nicht als organisierter Nervenstrang durch das Transplantat hindurch wachsen konnten und sich ungeordnete Minifaszikel ausbildeten. Aus pathophysiologischer Sicht müssen die transplantierten Axone zunächst durch die Waller-Degeneration abgebaut werden, bevor die Regeneration von Axonen innerhalb der Hüllstrukturen der transplantierten Nerven erfolgen kann.

Zum anderen unterstützen neurotrophe Faktoren den Regenerationsprozess entscheidend. Neurotrophe Faktoren sind integraler Bestandteil neurobiologischer Therapiestrategien (Schmidt CE, 2003). Eine kontrollierte Applikation wird jedoch aufgrund ihrer physikalischen Instabilität und kurzen Halbwertszeit erschwert. Das Einbringen neurotropher Substanzen in artefizielle Leitschienen, welche in die unmittelbare Umgebung des Defektes platziert werden, verbessert die kontrollierte Applikation. Eine distale Applikation neurotropher Faktoren wäre hierbei aufgrund des Kontinuitätsverlustes des Axons in Hinblick auf die axonale Regeneration sinnlos. Sie stellt jedoch, z.B. durch intrakavernöse Applikation, bei

inkompletter Schädigung der erektilen Nerven eine Therapieoption dar. Erfolge wurden durch Applikation von rekombinantem Protein (VEGF und BDNF) (Jung JW, 1998) oder der genterapeutischen Applikation neurotropher Faktoren (BDNF) in die Corpora cavernosa verzeichnet (Bakircioglu ME, 2001). Eine weitere experimentelle Therapieoption stellt der Gentransfer von NOS in glatte kavernöse Muskelzellen dar (Chancellor MB, 2003; Magee TR, 2002).

Bei kompletten Nervenläsionen nach Transplantation syngener SC in Silikonschienen konnte in unserer Arbeit eine verbesserte Regeneration in Hinsicht auf die Regenerationsdauer, Funktionalität, sowie histologisches Ergebnis im Vergleich zu Nerventransplantaten nachgewiesen werden. Allgemein hängt die Erfolgsrate artefizieller Leitschienen von der Ausbildung einer Fibrinbrücke ab, über die regenerationsfördernde Zellen wie Fibroblasten und SC aus den Nervenendigungen einwandern (Liu, 1996). Im weiteren Verlauf bilden die Axone Wachstumskegel entlang der neu gebildeten Matrix aus. Umgekehrt schlägt die Regeneration bei längerstreckigen Nervenläsionen fehl, wenn zu wenige regenerationsfördernde Zellen einwandern, um ein positives Wachstumsmilieu zu schaffen. Dies entspricht der Situation in unserem Tiermodell, bei dem die Exzision 5 mm langer Nervensegmente zu einer so hochgradigen Schädigung führt, dass intrinsische Reparaturmechanismen nicht ausreichen, um die erektile Funktion ohne rekonstruktive Maßnahmen wiederherzustellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Anwendung syngener SC in Silikonschienen die nNOS-Expression auf einem Level gehalten werden kann, welches für eine erfolgreiche Regeneration erforderlich ist. Beim Einsatz GDNF-überexprimierender SC konnte im Vergleich zu nativen Ratten sogar ein erhöhtes Vorkommen an nNOS-haltigen Nervenfasern festgestellt werden. Dies könnte die in Vorarbeiten ermittelte verkürzte Regenerationszeit erklären.

Im Gegensatz zur relativ raschen Nervenregeneration bei der Ratte, benötigt der Mensch allerdings deutlich längere Intervalle - so beträgt der Zeitraum bis zur Wiederherstellung der erektilen Funktion nach nervschonender radikaler Prostatektomie ca. 18-24 Monate (Meuleman EJH, 2003) - . Die prolongierte autonome Denervierung führt jedoch in vielen Fällen zur irreversiblen Degeneration der glatten Schwellkörpermuskulatur mit Verlust der spontanen Erektionsfähigkeit (Klein LT, 1997). Nach radikaler Prostatektomie ist deshalb bei vielen Patienten trotz nervschonender Operationstechnik keine oder nur eine partiell erhaltene erektile Funktion zu beobachten. Die Applikation neurotropher Faktoren stellt deshalb aus mehreren Gründen eine Erfolg versprechende Therapiestrategie dar: Einerseits wird die axonale Regeneration unterstützt und die erektile Funktion rascher wiederhergestellt;

andererseits trägt der beschleunigte Regenerationsprozess dazu bei, dass die Corpora cavernosa während der Nervenregeneration funktionsfähig bleiben. Die nNOS-Expression spielt dabei in Bezug auf apoptotische Prozesse, sowie zielgerichtete Regeneration eine entscheidende Rolle.

Autologe Nerven transplantation:

In der Vergangenheit spielte hauptsächlich die Nervenrekonstruktion durch autologe Nerven transplantation eine Rolle. Hinsichtlich dieses Rekonstruktionsversuches ist beim Menschen davon auszugehen, dass die Nerven transplantation als grobe Leitstrukturen für die regenerierenden Nervenfasern dienen. Da das neurovaskuläre Nervengeflecht die End-zu-End-Anastomose der Nervenenden erschwert und der transplantierte Nerv z.T. ein Hindernis für aussprossende regenerierende Axonsprosse darstellt, ist diese Methode der Rekonstruktion jedoch oft mit unzufriedenstellenden Ergebnissen verbunden (Kim ED, 2001). So kommt es nur bei weniger als einem Drittel der Patienten nach diesem Rekonstruktionsverfahren, bei dem Teile des N. suralis den Defekt des kavernösen Nervens überbrückt, zu einer entscheidenden Verbesserung der erektilen Funktion (Scardino PT, 2001; Walsh PC, 2001; Slawin KM, 2002). Die schlechten Ergebnisse bei Nerven transplantation konnten bei unserer Arbeit am Rattenmodell bestätigt werden; obwohl hierbei durch Vorhandensein eines erektilen Hauptstranges bessere Voraussetzungen als beim Menschen gegeben sind.

Neue Verfahren, bei der die Kontinuität von Nerven mit Hilfe artefizieller Nervenleitschienen -konkret mit Silikonröhrchen - erreicht werden soll, sind nach unseren Ergebnissen erfolgversprechender. Unsere präklinischen histologischen Ergebnisse weisen darauf hin, dass hierdurch geordnetes und zielorientiertes Wachstum von Nervenfasern erreicht werden kann. Artefizielle Leitschienen stellen aber auch in der Hinsicht erfolgversprechendere Interponate für den humanen Einsatz dar, da das neurovaskuläre Nervengeflecht in das Innere der Leitschienen eingebracht werden kann und damit keine exakte End-zu-End-Anastomose der Nervenenden erfolgen muss. Diesen Erfolg kann man durch dem Nerven bereitgestellte wachstumsunterstützende Faktoren steigern. Dabei konnte in Vorstudien bereits eine Überlegenheit dieser Nervenrekonstruktionsform funktionell gezeigt werden, die in dieser Arbeit erneut bestätigt werden konnte. Auf neurophysiologischer Ebene zeigt sich in unserer Arbeit die bedeutende Rolle der nNOS, deren Expression für eine erfolgreiche Regeneration essentiell ist. Betrachtet man die nNOS-Expression zeigt sich eine Überlegenheit der Rekonstruktion mit Hilfe artefizieller Leitschienen in Kombination mit Applikation neurotropher Faktoren gegenüber einer autologen Nerven transplantation. Eine entsprechende

Expression ist somit nach unseren Ergebnissen durch geeignete Rekonstruktionsverfahren zu erzielen.

Tiermodell:

Vergleicht man das verwendete Tiermodell mit dem Menschen, lassen sich viele neurophysiologische Parallelen erkennen. Komplette bilaterale Nervenläsionen, z.B. bei der radikalen Prostatovesikulektomie, führen auch beim Menschen zur irreversiblen erektilen Dysfunktion. Ähnlich dem Menschen besitzen Ratten eine regeneratorsche Reservekapazität, bei der die Schonung bzw. Rekonstruktion eines Teils der Nervenfasern ausreicht, die erektile Funktion wiederherzustellen. Positive funktionelle und histologische Resultate im Tiermodell lassen sich somit bezüglich des verwendeten Rekonstruktionsverfahrens auf den Menschen übertragen.

Einschränkungen bestehen unter anderem hinsichtlich der Anatomie. Bei Ratten finden sich multiple parallel laufende erektile Nervenfasern paraprostatisch, unter denen ein Hauptnervenstrang ausgemacht werden kann. Dieser Hauptnervenstrang wurde für unsere Rekonstruktionsverfahren verwendet. Im Gegensatz dazu bilden die erektile Nervenfasern beim Menschen ein neurovaskuläres Geflecht um die Prostata.

Auch die von uns im Tiermodell festgelegte Defektstrecke von 5 mm ist beim Menschen meist größer. Hier müssen z.T. nach radikaler Prostatovesikulektomie mehrere Zentimeter überbrückt werden.

Weiterhin muss beim Menschen von einer erheblich längeren Regenerationsdauer ausgegangen werden. Zur Wiederherstellung der erektilen Funktion nach bilateraler Durchtrennung bedarf es oft längerer Zeiträume von bis zu 24 Monaten (Meulemann EJH, 2003).

5.3 Zukunftsaussichten

Die bei dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen für eine Überlegenheit der Nervenrekonstruktion mit Hilfe artefizieller SC besiedelter Leitschienen und zusätzlicher Applikation neurotropher Faktoren gegenüber der autologen Nerventransplantation. Bei der Nerventransplantationsgruppe wurde eine signifikant erniedrigte nNOS-Expression festgestellt; weiterhin waren histologische und funktionelle Ergebnisse unterlegen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei zeitnaher Wiederherstellung der Axonkontinuität, nach läSIONsbedingter Abnahme der nNOS-Expression im neuronalen Gewebe, zu einem erneuten Anstieg kommen kann. Dies stellt eine essentielle Voraussetzung zum Erhalt bzw. zum Wiedererlangen der erektilen Funktion dar. NO kommt dabei eine bedeutende Rolle bei der Regeneration, der Apoptosehemmung und beim Erektionsprozess selbst zu. Eine Atrophie der glatten Schwellkörpermuskulatur und damit eine irreversible Schädigung wird verhindert; dabei spielt das kurze Zeitintervall der Rekonstruktion eine entscheidende Rolle. Eine schnelle Wiederherstellung der axonalen Kontinuität des Nervens begünstigt dessen Überleben und spätere Funktion (Fu SY, 1997). Die zeitnahe Wiederherstellung kann, wie hier gezeigt, erfolgreich mit Hilfe artefizieller Leitschienen erreicht werden. Die Applikation neurotropher Substanzen kann diesen Prozess beschleunigen, und es werden höhere Erfolge als bei der autologen Nervenrekonstruktion erzielt.

Nach Interpretation der Ergebnisse stellt sich die Frage, die gewonnenen Kenntnisse zu nutzen, um eine verbesserte Regeneration erektiler Nerven nach Läsion zu erlangen.

In mehreren Studien wird in letzter Zeit - mit dem Ziel neue Therapieformen zu entwickeln - die regenerationsfördernde bzw. erektionserhaltende Wirkung der NOS erforscht. Hierbei wird unter anderem versucht, durch Gentherapie die Expression der NOS zu erhöhen und damit einen positiven Effekt auf die Erektion zu erhalten. Verschiedene Vektoren werden benutzt um die Zielzelle zu erreichen. Dabei verwendet man unter anderem Plasmide, Adenoviren und mit Adenoviren transduzierte Myoblasten als Vektoren (Tirney S, 2001). Diese Vektoren, die mit Genen der NOS versehen werden, werden direkt in den Schwellkörper injiziert. Dabei stellte sich in mehreren Studien an Ratten ein positiver Effekt auf den intrakavernösen Druck und damit auf die Erektion ein.

Zum Beispiel erhöhte sich die Expression der nNOS bei einer Studie mit gealterten Ratten durch direkte Injektion eines mit nNOS-Gen versehenen Adenovirus in die Schwellkörper. Der intrakavernöse Druck wurde daraufhin nach verschiedenen Zeitintervallen unter elektrischer Stimulation der kavernösen Nerven bestimmt. Es stellte sich, bezüglich der Erektionsfähigkeit, ein positiver Effekt ein. Der maximale intrakavernöse Druck bei

elektrischer Stimulation der Nn. erigentes im Bezug zum arteriellen Blutdruck konnte mit Hilfe der Injektionen gegenüber Kontrollen für mindestens 18 Tage signifikant angehoben werden (Magee TR, 2002). In weiteren Studien wurden Gene anderer Isoformen der NOS in die Zellen des Schwellkörpergewebes eingeschleust. Auch dort stellten sich erektionsfördernde Effekte ein. Durch Injektion der iNOS beispielsweise, konnte sowohl ein erhöhter Basaldruck, als auch Maximaldruck des Schwellkörpers gemessen werden (Chancellor MB, 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden auch unter Verwendung der eNOS verzeichnet (Champion HC, 1999). In weiteren Studien stellte sich heraus, dass nach Applikation von mit Adenovirus transduzierten Myoblasten als Vektor, sowohl die intrazelluläre Expression am Zielort am größten war, als auch der intrakavernöse Druck am meisten anstieg (Tirney, 2001). In einer aktuellen Publikation wurde erstmals über den Einsatz der Gentherapie zur Behandlung der erektilen Dysfunktion beim Menschen berichtet: Im Rahmen einer Phase I Studie wurden Plasmid Vektoren (hMaxi-K), die das hSlo Gen exprimieren, welches eine Untereinheit des humanen kavernösen Maxi-K Ionenkanals kodiert, intrakavernös injiziert (Melman, 2005).

Diese Studien eröffnen die Möglichkeit neuer Therapieformen bei erektiler Dysfunktion nach radikaler Prostatovesikulektomie. Unter Anwendung des Tissue-Engineerings, bei der wie in dieser Arbeit gezeigt die Expression der nNOS auf einem Niveau gehalten werden kann, welches für den Erhalt der Erektion wichtig ist, sind, wie gezeigt, gute Ergebnisse zu erreichen. Die entscheidende Bedeutung der nNOS im Regenerationsprozess lässt die Frage sinnvoller Kombinationen einer Rekonstruktionen mit Hilfe neurotropher Faktoren beschichteter artefizieller Leitschienen mit Gentherapie - z.B. durch Injektion von NOS-Genen ins Schwellkörpergewebe - aufkommen. Dadurch wäre voraussichtlich eine gesicherte NOS-Expression zu erreichen, welche den Regenerationsvorgang verbessern bzw. apoptotische Prozesse vermindern, sowie im Erektionsvorgang selbst eine unterstützende Rolle spielen könnte.

Als zukünftiges Ziel dieser Arbeit soll eine Anwendung der gewonnen Theorien am Menschen erfolgen. Dazu bedarf es weiterführender klinischer Studien. Der Mensch unterscheidet sich im Hinblick der Nervenregeneration vom Rattenmodell hinsichtlich Anatomie und Regenerationszeit. Jedoch bestehen grundlegende neurophysiologische Parallelen. Unter anderem findet sich die bedeutende Rolle der nNOS in Regenerationsprozess auch beim Menschen. Somit lassen die gewonnen Ergebnisse eine Übertragbarkeit auf den Menschen erhoffen. Ob es mit Hilfe SC-beschichteter Nervenleitschienen beim humanen Nervengewebe zu vergleichbar erfolgreichen Ergebnissen

kommen wird, wird sich zeigen. Die in dieser Arbeit geschilderte Rekonstruktionsmethode, bei der nicht resorbierbare Silikonröhrchen als Leitschienen für zielgerichtetes Nervenwachstum dienen, sollte bei der Übertragung auf den Menschen modifiziert werden. Zum einen sollten aufgrund chronischer Fremdkörperreaktionen mit der Gefahr der Nervenkompression beim Menschen biodegradierbare, semipermeable Materialien als Leitschienen dienen (Dahlin LB, 2001). Geeignete Materialien stehen bereits kommerziell zur Verfügung. Zum anderen sollten diese Leitschienen mit autologen SC beschichtet werden. Autologe SC können durch periphere Nervenbiopsie z.B. des N. suralis gewonnen werden. Erste unveröffentlichte Pilotexperimente von Teilnehmern unserer Arbeitsgruppe zeigten die erfolgreiche Übertragbarkeit auch auf humanes Nervengewebe.

Die Anwendung der Forschungsergebnisse soll in der klinischen Umsetzung vorerst bei der Rekonstruktion erektiler Nerven angewandt werden. Hierbei soll die Rekonstruktion erektiler Nerven bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom erfolgen, bei denen eine Infiltration der Nerven eine nervenschonende Operation aus onkologischer Sicht unmöglich macht. Nach Exzision eines Abschnitts des betroffenen Nervens soll unter obengenannten Modifizierungen ein Rekonstruktionsversuch parallel dem Tiermodell erfolgen.

Zusätzlich sind, bei verlangsamter Regeneration im humanen Nervengewebe, regenerationsfördernde Therapien, wie der Einsatz von Gentherapie, zu überprüfen. Durch diese könnten in Kombination mit dem in dieser Arbeit dargestellte Tissue-Engineerings insgesamt noch erfolgversprechendere Ergebnisse erzielt werden.

AIRAKSINEN MS, Saamara M: The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value.

Nature Reviews Neuroscience 3 (2002) 383-394

ALDERTON WK, Cooper CE, Knowls RG: Nitric oxide synthases structure, function and inhibition.

Biochem.J 357(2001) 593-615

AHMED I EL-SAKKA, Maqsood U Hassan, Selph C, Perinchery G, Dahiya R, Lue T
Effect of cavernous nerve freezing on protein and gene expression of nitric oxide synthase in the rat penis and pelvic ganglia.

J of Urology 160 (1998) 2245-52

AUS G, Abbou CC, Pacik D, Schmid HP, Van Poppel H, Wolff JM:

Guidelines on prostate cancer.

EAU Guidelines 2003

BALL RA, Lipton SA, Dreyer EB, Richie JP, Vickers MA

Entubulization repair of severed cavernous nerves in the rat resulting in return of erectile function.

J. Urol., 148(1992) 211-215

BALL RA, RICHIE JP, VICKERS MA

Microsurgical nerve graft repair of the ablated cavernosal nerve in the rat.

J. Surg. Res., 53 (1992) 280-286

BAKIRICIOGLU ME , Lin CS, Fan P, Sievert KD, Kann YW, Lue TF (2001).

The effect of adeno-associated virus mediated brain derived neurotrophic factor in an animal model of neurogenic impotence.

J Urol 165:2103-2109

BERSTEIN-GORAL H, Diener PS, Bregman BS: Regeneration and sprouting axons differ in their requirements for growth after injury.

Exp Neurol 148(1997) 51-72

BIDMON HJ, Emde B, Kowalski T, Schmitt M, Mayer B, Kato K, Asayama K, Witte OW, Zilles K: Nitric oxide synthase-I containing cortical interneurons co-express antioxidative enzymes and anti-apoptotic Bcl-2 following focal ischemia : Evidence for direct and indirect mechanism towards their resistance to neuro-pathology.
J. Chem.Neuroanat. 22(2001) 167-184

BLESCH A, Lu P, Tuszynski MH: Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair.
Brain Res Bull 57: 833-838, 2002

BRÜCK W: The role of macrophages in Wallerian degeneration.
Brain Pathol 7(1997) 741-752

BRUSHART TM: Motor axons preferentially reinnervate motor pathways.
J. Neurosci. 13(1993) 2730-8

BÜNGNER O: Über die die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen.
Path Anat 10 (1891) 321-393

BURNETT AL, Tillmann S, Chang T, Epstein J, Lowenstein C, Bredt D, Solomon H, Walsh P: Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis.
J of Urology 150(1993) 73-6

BURNETT AL: Role of nitric oxide in the physiology of erection .
Reprod 52 (1995) 485-489

BURNETT AL, Saito S, Maguire MP, Yamaguchi H, Chang TSK, Hanley DF:
Localisation of nitric oxide synthase in spinal nuclei innervating pelvic ganglia.
J.Urol 153 (1995) 212-217

BURNETT AL : Novel nitric oxid signalig mechanisms regulate the erectile response.

Int J Impot Res 16 Suppl 1 (2004)15-19

BUTTE MJ: Neurotrophic factor structure reveal clues to evolution, binding spezifitiy and receptor activation.

Cell Mol Life Sci 58(2001) 1003-1013

CARRIER S, Zvara P, Nunes L, Kour N, Rehman J, Lue T

Regeneration of nitric oxid synthase containing nerves after cavernous nerve neurotomy in the rat.

J. Urol 153 (1995) 1722-1727

CASHEN DE, MacIntyre DE, Martin WJ: Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase.

Br J Pharmacol. 136(5) (2002) 693-700

CASPERS C: Versuche zur Rekonstruktion erektiler Nerven über Silikonröhrchen in Kombination mit gezüchteten homologen Schwanschen Zellen bei der Ratte.
Dissertationsarbeit TU-München Urologie 2004

CATALONA WJ, BIGG SW

Nerve-sparing radical prostatectomy: evaluation of results after 250 patients.

J. Urol., 143: (1990) 538-544

CHANCELLOR MB, Tirney S , Mattes CE, Tzeng E, Birder A, Kanai AJ, de Groat WC, Huard J, Yoshimura N: Nitric oxide synthase gene transfer for erectile dysfunction in a rat model.

BJU Int. 91(7) (2003) 691-696

CHAMPION HC, Bivalacqua TJ, Hyman AL, Ignarro LJ, Hellstrom WJG, Kadowitz PJ: Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96 (1999) 11648-11652

CHUNG HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM: Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis.

Biochem Biophys Res Commun 282(5)(2001) 1075-1079

CRISTINO L, Pica A, Della Corte F; Bentivoglio M: Coinduction of nitric oxide synthase, BCL-2 and growth associated protein-43 in spinal motoneurons during axon regeneration in the lizard tail.

Neuroscience 101(2000) 451-8

DAHLIN LB, Lundborg G: Use of tubes in peripheral nerve repair.

Neurosurgery Clinics of North America 12(2001) 341-352

DANIELSEN N, Kerns JM, Holmquist B, Zhao Q, Lundborg G, Kanje M:

Predegeneration enhances regeneration into acellular nerve grafts.

Brain Res 681(1995) 105-108

DAHLIN LB, Lundborg G: Use of tubes in peripheral nerve repair.

Neurosurgery Clinics of North America 12(2001) 341-352

DUBEY N, Letourneau PC, Tranquillo RT: Guide neurote elongation and schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in stimulation peripheral nerve Regeneration.

Exp. Neurol 158(1999) 338-350

DUCKER TB, Hayes GJ

Experimental improvements in the use of siliastic cuff for peripheral nerve repair.

J. Neurosurg 28(1968) 582-587

ECKHARD C :Investigation of penile erection in the dog.

Beit Anat Physiol 3 (1863)123-150

- EL-SAKKA A**, Maqsood U Hassan, Selph C, Perinchery G, Dahiya R, Lue T
Effect of cavernous nerve freezing on protein and gene expression of
nitric oxide synthase in the rat penis and pelvic ganglia.
J of Urology 160 (1998) 2245-52
- ERNST AF**, Gallo G., Letourneau P.C., MeLoon. S.C. Stabilization of growing retinal axons
by the combined signaling of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor.
J. Neurosci. 20(2000) 1458-1469
- EVANS G**, Peripheral nerve injury : A review and approach to tissue engineering constructs
The anatomical record 263(2001) 396-404
- FERRINI MG**, Magee TR, Vernet D, Rajfer J, Gonzales-Cadavid N: Penile neuronal nitric
oxide synthase and its regulatory proteins are present in hypothalamic and
spinal cord regions involved in the control of penile erection.
J comp Neurol. 458(2003) 46-61
- FANSA H** , Keilhoff G, Förster G, Seidel B, Wolf G, Schneider W:
Acellular muscle with schwann-cell implantation : An alternative biological nerve
conduit
J Reconstr Microsurg;15(1999) 531 -537
- FANSA H**, Keilhoff G: Faktoren, die die Regeneration peripherer Nerven beeinflussen.
Handchir Mikrochir Plast Chir 35(2003) 72-82
- FRAIMAN MC**, Lepor H, McCullough AR Changes in penile morphometrics in men with
erectile dysfunction after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy.
Mol Urol 3(1999) 109-115
- FRANCIS SH**, Corbin J: Cyclic nucleotide –dependent protein kinases receptors
for cGMP action .
Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.,36 (1999) 275-328

FROSTIC SP, Yin Q, Kemp GJ: Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration.

Microsurgery 18(1998) 397-405

FU SYGHALAYINI IF : Nitric oxide –cyclic GMP pathways with some emphasis on Cavernosal contractility

Int J Impot Res. (2004)

GOLDBERG JL, Barres ba; The relationship between neuronal survival and regeneration.

Annu Rev Neurosci 23(2000) 579-612

GONZALES-CADAVID NF, Rajfer J. : Therapeutic stimulation of penile nitric oxide synthase (NOS) and related pathways.

Drugs Today 36 (2000) 163-174

GWAG BJ, KIM SH: Antiapoptotic and pronecrotic actions of neurotrophins.

Antioxid Redox Signal 5(2003) 621-627

HAUTMANN RE, HULAND H

Prostatakarzinom, In Urologie.

Springer Verlag Heidelberg, 2001, 2. Aufl., 237-253

HAYASHIDA H, Okamura T, Tomoyoshi T, Tod N: Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum.

J.Urol.,155(1996) 1122-1127

HENEKA M.T., Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U,

Klockgether T: Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis

Factor alpha/lipopolysaccharide.

J. Neurochem. 71(1998) 88-94

HICK A. : Muskelphysiologie ,Kontraktionsmechanismus.

In „Physiologie“ München, 2000, 3.Aufl., 301-303

HOKE H, Ho T, Crawford TO, Lebel C, Hilt D, Griffin JW: Glial cell line derived neurotrophic factor alters axon Schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve.

J Neurosci 23(2003) 561-7

IDE C: Peripheral nerve Regeneration.

Neurosci Res 25(1996) 101-121

IGNARRO LJ, Bush PA, Burga GM: Nitric oxide and cyclic GMP formation upon Electrical field stimulation cause relaxation of cavernosum smooth muscle.

Biochem Biophys Res Commun 170(1990) 843-850

JULIFS DM: Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotid

Phosphodiesterases (PDEs).

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 135, (1999)67-173

JUNG GW, Spencer EM, Lue TF Growth hormone enhances regeneration of nitric oxide synthase-containing nerves after cavernous nerve neurotomy in rats.

J Urol 16(1998)1899-1904

KEILHOFF G, Fansa H, Wolf G:

Neuronal nitric oxide synthase is the dominant nitric oxide in the survival of dorsal root ganglia after peripheral nerve axotomy.

J of chemical neuroanatomy 24(2002) 181-7

KEILHOFF G, Fansa H, Wolf G: Nitric oxide synthase, an essential factor in peripheral nerve regeneration.

Cell.Mol.Biol. 49(2003) 885-897

Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR, Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression.

J. Biol. Chem 272 (1997) 1402-1411

KIM ED, Nath R, Slawin KM, Kadmon D, Miles BJ, Scardino PT: Bilateral nerve grafting during radical retropubic prostatectomy: extenes follow-up.

Urology 58(6),2001,983-987

KLOTZ L: Advances in nerve sparing for radical prostatectomy.

Urology, 54(1999) 956-959

KLEIN LT, Miller MI, Buttyan R, Raffo AJ, Burchard M, Devris G, Cao YC,

Olsson C, Shabsigh R: Apoptosis in the rat penis after penile denervation.

J Urol 158(2) (1997) 626-630

KUHLENGEL KR, Bunge MB, Bunge RP: Implantation of cultured sensory neurons and Schwann cells into lesions neonatal rat spinal cord.

J. Comp Neurol 293(1990) 63-73

KWON YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM:

Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum deprived apoptosis by nitric oxide production

J.Biol. Chem. 276(2001) 10627-33

LAURIKAINEN A, Hiltunen JO, Vanhatalo S, Klinge E, Saarma M: Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves.

Cell Tissue Res 302(2000) 321-329

- LIU MH:** Growth factors and extracellular matrix in peripheral nerve regeneration, studied with a nerve chamber.
J Periph Nerv Syst 2:97(1996).110
- LUE TF:** Neurogenic erectile dysfunction.
Clinical autonomic Research 11(2001) 285-294
- LUNDBORG G:** Nerve regeneration and repair: a review.
Acta. Orthop. Scand., 58(1987) 145-169
- LUNDBORG G, Rosen B, Dahlin L, Holmberg J, Rosen I:** Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: A 5-year follow-up.
Journal of Hand Surgery 29B: 2(2004) 100-107,
- LUTHER D:** Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Regeneration peripherer Nerven nach operativer Durchtrennung und ihre Beeinflussung durch ACTH.
Vet. Med. Diss. Hannover (1988)
- MADERSBACHER S, Studer UE:** Zunehmende Bedeutung der postoperativen funktionellen Situation.
Urologe 43(2004) 127-149
- MAGEE TR, Ferrini M, Davila HH, Zeller CB, Vernet D, Sun J, Lalani R, Burnett AL, Rajfer J, Gonzales-Cadavid NF:** Protein inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) And the N-methyl-D-aspartate receptor are expressed in the rat and mouse Penile nerves and colocalize with penile neuronal NOS.
Biol Reprod. 68(2) (2003) 478-488
- MAGEE TR, Ferrini M, Garban HJ, Vernet D, Mitani K, Rajfer J, Gonzales-Cadavid NF:** Gene therapy of erectile dysfunction in the rat with penile neuronal nitric oxide Synthase.
Biol Reprod 67(3) (2002) 1033-41

MAGEE TR, Ferrini M, Garban HJ, Vernet D, Mitani K, Rajfer J, Gonzales-Cadavid NF:
Gene therapy of erectile dysfunction in the rat with penile neuronal nitric oxide
Synthase.
Biol Reprod 67(1) (2002) 20-8

MA QP, Tian L, Woolf CJ : Resection of sciatic nerve re-triggers central sprouting of A-fibre
Primary afferents in the rat.
Neurosci Lett 288(2000) 215-18

MAY F, Weidner N, Matiasek K, Caspers C, Mrva T, Vroemen M, Henke J, Lehmer,
Erhardt W, Gänsbacher B, Hartung R:
Schwann cell seeded guidance tubes restore erectile function after ablation
of cavernous nerves in rats.
J Urol 172(1) 2004 374-377

MEULEMANN EJH, Mulders PFA Erectile function after radical prostatectomy:
a review.
Eur Urol 43(2003) 95-102

Me A, Bar-Chama N, McCullough A, Davies K, Christ G (2005).
The first human trial for gene transfer therapy for the treatment of erectile
dysfunction: Preliminary results.
European Urology 48:314-318

MUMMENTHALER M, Stöhr M, Müller-Vahl: Läsionen peripherer Nerven.
Stuttgart,1998,7. Aufl., 5-21 Thieme

MUMTAZ FH, Khan MA, Thompson CS, Morgan RJ, Mikhailidis DP:
Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological
Implications.
BJU International 85(2000) 567-78

- NEHRA A**, Goldstein I, Pabby A et al Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure.
J Urol 156(1996) 1320-1329
- OPPENHEIM RW**, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevetie DM, Wang S: Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF.
Nature 373(1995) 344-346
- PICKARD R**: The role of nitric oxide and other neurotransmitters in erectile function.
Urology 6 (1996) 347-351
- PICKARD RS**, Powell PH, Zar MA: Nitric oxide and cyclic GMP formation following relaxant nerve stimulation in isolated human corpus cavernosum.
J.Urol.,75 (1995)516-522
- PODLASEK CA**, Gonzales CM, Zelner DJ, Jiang HB, McKenna KE, McVary KT
Analysis of NOS isoform changes in a post radical prostatectomy model of erectile dysfunction.
Int J Impot Res. 13 Suppl 5 (2001) 1-15
- QUINLAN DM**, Nelson RJ, Parin AW, Mostwin JL, Walsh PC
The rat as a model for the study of penile erection.
J. Urol., 141(1989) 656-661
- QUINLAN DM**, Epstein JI, Carter BS, Walsh PC (1991)
Sexual function following radical prostatectomy: influence of preservation of neurovascular bundles.
J. Urol., 145(1991) 998-1002
- RODRIQUEZ FJ**, Verdú E, Ceballos D, Nvarro X: Nerve guides seeded with autologous swann cells improve nerve regeneration.
Exp Neurol 161(2000) 571-584

SAUR D, Vanderwinden JM, Seidler B, Schmid RM, De Laet MH, Alescher HD:
Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric
oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis.
PNAS 101(2004) 1662-1667

SAUR D, Seidler B, Paehge H, Schusdziarra V, Allescher HD:
Complex Regulation of Human Neuronal Nitric-oxide Synthase Exon 1c Gene
Transcription.
J.of Biological Chemistry Vol. 277, No.28 (2002) 25798-25814

SCARDINO PT, KIM ED
Rationale for and results of nerve grafting during radical prostatectomy
Urology, 57(2001) 1016-1019

SCHMIDT CE, Leach JB: Neural Tissue Engineering: Strategies for repair and regeneration.
Annu Rev Biomed Eng 5: 293-347, 2003

SCHRÖEDER J: Normale Histologie und Histopathologie der Läsionen des peripheren
Nervensystems.
In „Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome“

SCHRÖDER JM: Pathology of peripheral nerves. An atlas of structural and molecular
Pathological changes. Berlin, Heidelberg, New York:
Springer Verlag 2001

SECKEL BR: Enhancement of peripheral nerve regeneration
Muscle nerve, 13(1990) 785-800

SEGAL R, Machiraju U, Larkins M : Tortuous peripheral arteries : a cause of focal
Neuropathy – Case report.
J. Neurosurg. 76(1992) 701-4

SEZEN SF, Hoke A, Burnett AL, Snyder SH. Immunophilin ligand FK506 is neuroprotective for penile innervation.

Nat Med 7(2001) 1073-1074

SHAMASH S, Reichert F, Rosthenker S: The cytokine network of Wallerian Degeneration: Tumor-necrosis-factor alpha, interleukin-1-alpha and interleukin-1-beta

J Neurosci 22(2002) 3052-3060

SHI JP, Zhao YM, Qi G: Protein and mRNA expression of nitric oxide synthase isoforms I and III in rat penile spongium tissues.

Zonghua Nan Ke Xue. 9 (2003) 663-668

SIEBERT H, Brück W,: The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after periperal nerve axotomy : a study in different knock out mice.

Brain Res 960(2003) 152-6

SIEGEL T, MOUL JW, SPEVAK M, ALVORD WG, COSTABILE RA

The development of erectile dysfunction in men treated for prostate cancer.

J. Urol. 165(2001) 430-435

SIMONDS WF: : G protein regulation of adenylate cyclase.

Trends Pharmac. 73 (1999)

SLAWIN KM, Canto EI, Sharia SF, Gore JL, Kim E, Kattan MW,

Wheeler TM, Nath RK

Sural nerve interposition grafting during radical prostatectomy.

Rev. Urol. 4(2002) 17-23

SORENSEN J, Haase G, Krarup C, Gilgenkrantz H, Kahn A, Schmalbruch H: Gene transfer to Schwann cells after peripheral nerve injury: a delivery system for therapeutic agents.

Ann Neurol 43(2) (1998) 205-211

- THIPPESWAMY T**, Morrriis R : Cyclic guanosine 3',5' -monophosphate-mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurones.
Brain Res 774(1997) 116-122
- TIRNEY S**, Mattes CE, Yoshimura T, Ozawa H, Tzeng E, Birder LA, Kanai AJ, Huard J, de Groat WC, Chancellor MB:
Nitric oxide synthase gene therapy for erectile dysfunction: comparison of plasmid, adenovirus-transduced myoblast vectors.
Mol Urol 5(1) (2001) 37-34
- TERZIS JK**, Sun DD, Thanos PK: Historical basis science review: Past, present, and future of nerve repair.
J. Reconstr. Microsurg; 13(1997) 215-225
- USER HM**, Hairston JH, Zelner DJ, McKenna KE, McVary KT:
Penile weight and cell subtype specific changes in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction.
J Urol 169 (2003)1175-1179
- VAN WANGENEN S**, Rehder V: Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide depends on soluble guanyl cyclase.
J.Neurobiol. 46(2001)206-219
- VON KORFF N**, Ornel J, Keefe FJ : Grading the severity of pain.
Pain 30(1992) 133-49
- VROMEN M**, Weider N: Purification of Schwann cells by selection of P75 low-affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve.
J Neurosci Methods 124(2003) 135-143

WALSH PC: Nerve grafts are rarely necessary and are unlikely to improve sexual function in men undergoing anatomic radical prostatectomy.

Urology, 7 (2001) 1020-1024

WALSH PC, Donker PJ

Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention.

J. Urol.128 (1982) 492-497

WALSH PC :Anatomic radical prostatectomy: evolution of the surgical technique.

J Urol., 160(1998) 2418-2424

ZHANG X, HU L, YIN J, MO Z, CHEN J

The rat model of erectile dysfunction caused by cavernous nerve ablation.

Chin Med J., 11(2001)4: 391-393

Abb	Abbildung
Bzw.	beziehungsweise
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
d.h.	das heißt
ED	erektile Dysfunktion
GDNF	Glial cell line derived neurotrophic factor
GAPDH	Glyzerinaldehyd 3-phosphat dehydrogenase (Housekeeping Gen)
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Lap	Laparotomie
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (mm Hg)
MW	Mittelwert
N	nervus
NaCl	Natrium Chlorid
Nervex	Gruppe der Versuchstiere mit Exzision eines 5mm großen Teil der kavernösen Nerven beidseits ohne anschließendem Rekonstruktionsversuch
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
iNOS	inducible Stickstoffmonoxidsynthase
OP	Operation
p (b)	Basisdruck im Corpus cavernosum (mmHg)
p (max)	maximaler Druck nach elektrischer Stimulation im Corpus cavernosum
PCR	Polymerase chain reaction
PKG	Proteinkinase G
PDE	Phosphodiesterase
PGP9.5	Protein Gene Product 9.5
PnNOS	penile neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
RT-PCR	Real-time-PCR
SHAM	Gruppe der Versuchstiere mit Laparotomie und Freilegung der kavernösen Nerven bilateral ohne provozierte Nervenläsion
SC	Schwann-Zelle
SD	Standardabweichung

sog.	sogenannt
Trans	Gruppe der Versuchstiere mit Zustand nach autologer Nerven- transplantation des Nervus genitofemoralis in den kavernösen Nervendefekt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

- Abbildung 1 Verlauf der erektilen Nerven beim Menschen (nach Lepor et al., 1985).
- Abbildung 2 Neuroanatomische Übersicht im Becken der Ratte (Quinlan et al. 1989).
- Abbildung 3 Bluteinstrom ins Corpus cavernosum nach Relaxation der glatten Muskelzellen, Deutschesärzteblatt 102, Ausgabe 23(2005) S. A-1665.
- Abbildung 4 Relaxation der glattemuskulären Zellen über NO-cGMP Mechanismus, Deutschesärzteblatt 102, Ausgabe 23(2005) S. A-1665.
- Abbildung 5 Schematische Darstellung eines peripheren Nerven, (Heath und Rutowski1, 1998).
- Abbildung 6 Schematischer Aufbau eines Neuron.
- Abbildung 7 Läsionen peripherer Nerven, Mumenthaler M, Stöhr M, Müller-Vahl Stuttgart,1998,7. Aufl., 5-21 Thieme.
- Abbildung 8 Läsionen peripherer Nerven, Mumenthaler M, Stöhr M, Müller-Vahl: Stuttgart,1998,7. Aufl., 5-21 Thieme.
- Abbildung 9 Funktionszyklus Stickstoffmonoxid.
- Abbildung 10 Rezeptorvermittelte Aktivitätssteuerung PnNOS.
- Abbildung 11 Erektionsvorgang, Rolle der NOS-Isoformen.
- Abbildung 12 Darstellung der Nervenregeneration über Nerventransplantate, (modifiziert nach Den Dunnen et al., 1996).
- Abbildung13 Versuch der Nervenrekonstruktion mit Hilfe eines Silikonröhrchens, (modifiziert nach Fields, 1989).
- Abbildung 14 Markierte Hybridisierungssonde, Biochemie.
- Abbildung 15 RT-PCR Reporterfarbstoff.
- Abbildung 16 Ermittlung des CT-Wertes bei RT-PCR.
- Abbildung 17 Silikonröhrchen nach der Implantation, Caspers C.
- Abbildung 18 Schematische Darstellung der neuroanatomischen Verhältnisse im Becken der Ratte,(modifiziert nach Ball RA, 1992).
- Abbildung 19 Transplantation des N. genitofemoralis, Ball RA, 1992.
- Abbildung 20 Elektrische Neurostimulation der kavernösen Nerven intraoperativ.
- Abbildung 21 Druckmessung im Corpus cavernosum, (modifiziert nach Martinez, Pineiro, 1994).
- Abbildung 22 Intrakavernöse Druckmessung, Gerät: Andromeda Ellipse 4.
- Abbildung 23 Aufzeichnung einer elektrischen Neurostimulation.
- Abbildung 24 Perfusionspumpe: Regio Analog, Modell ISM 830 (Wertheim-Mondfeld).
- Abbildung 25 Perfusionsvorbereitung.

- Abbildung 26 Perfusion eines Versuchstiers mit Paraformaldehydlösung.
- Abbildung 27 Intraoperative Schwellkörperpräparation.
- Abbildung 28 Zeitplan der Aufreinigung primärer SC aus dem Nervus ischiadicus adulter Ratten, (Vroemen und Weidner, 2003).
- Abbildung 29 Bildbeispiel für positive Erektion mit Größenzunahme und Blaufärbung.
- Abbildung 30 Erektionshäufigkeit innerhalb der verschiedenen OP-Gruppen bei bilateraler seitengetrennter Stimulation 6 Wochen nach der Primäroperation.
- Abbildung 31 Darstellung MW der intrakavernösen Basisdrücke (mmHg) nach Gruppen.
- Abbildung 32 Mittelwerte der Intrakavernösen Maximaldrücke [mmHg] nach Stimulation; Darstellung der verschiedenen OP-Gruppen.
- Abbildung 33 Mittelwerte der Zeit [s], welche nach Stimulationsbeginn benötigt wurde, den intrakavernösen Maximaldruck zu erreichen; Darstellung der verschiedenen OP-Gruppen.
- Abbildung 34 Darstellung der Mittelwerte des systemischen Blutdrucks [mmHg] nach Gruppen.
- Abbildung 35 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen mRNA Expression mNOS zu dem neuronalen Marker PGP9.5.
- Abbildung 36 Mittelwerte der rel. mRNA Expression mNOS/rPGP9.5 der verschiedenen Gruppen.
- Abbildung 37 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen mRNA Expression des neuronalen Markers „PG P9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“.
- Abbildung 38 Mittelwerte der rel. mRNA-Expression PGP9.5/GAPDH der verschiedenen OP-Gruppen
- Abbildung 39 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen mRNA Expression mNOS zu dem globalen Gewebsmarker GAPDH.
- Abbildung 40 Mittelwerte der rel. mRNA-Expression mNOS/GAPDH der verschiedenen OP-Gruppen.
- Abbildung 41 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen RNA Expression riNOS zu dem globalen Gewebsmarker GAPDH.
- Abbildung 42 Mittelwerte der rel. RNA-Expression riNOS/GAPDH der verschiedenen OP-Gruppen.
- Abbildung 43 Darstellung der für die Einzeltiere ermittelten Mittelwerte der relativen RNA Expression reNOS zu dem globalen Gewebsmarker GAPDH.

Abbildung 44 Mittelwerte der rel. mRNA Expression reNOS/GAPDH der verschiedenen OP-Gruppen.

Abbildung 45 optische Darstellung der experimentell ermittelten Beziehung zwischen intrakavernösem Maximaldruck und Expression von nNOS/PGP9.5.

Abbildung 46 Beispiel für den Querschnitt eines Nervenregenerats mit Leitschiene.

Abbildung 47 Lichtmikroskopisches Präparat.

- Tabelle1 Übersicht der wichtigsten Wachstumsfaktoren /Funktion in der Regeneration peripherer Nerven.
- Tabelle 2 Tiergruppen mit Gruppenname und durchgeführter Operationstechnik.
- Tabelle 3 Gruppenname mit n= Anzahl der Gruppentiere, Anzahl der Rattenquantifizierung.
- Tabelle 4 Funktionelle Ergebnisse der verschiedenen OP-Gruppen sechs Wochen nach der Primäroperation.
- Tabelle 5 Einzelergebnisse der Tiere mit Rekonstruktionsversuch durch mit GDNF-überexprimierenden SC beschichteten Silikonröhrchen.
- Tabelle 6 Einzelergebnisse der Tiere mit Rekonstruktionsversuch durch Transplantation des N. genitofemoralis.
- Tabelle 7 Einzelergebnisse der Tiere mit Rekonstruktionsversuch durch mit SC beschichteten Silikonröhrchen.
- Tabelle 8 Mittelwerte und Standardabweichungen bei den verschiedenen OP-Gruppen.
- Tabelle 9 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression mNOS gegen den neuronalen Marker „PGP9.5“, SC+GDNF-Gruppe.
- Tabelle 10 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression mNOS gegen den neuronalen Marker „PGP9.5“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierte Tiere aus der SC-Gruppe.
- Tabelle 11 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression mNOS gegen den neuronalen Marker „PGP 9.5“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der Trans-Gruppe.
- Tabelle 12 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression mNOS gegen den neuronalen Marker „PGP 9.5“, Kontroll-Gruppen.
- Tabelle 13 Mittelwerte der mNOS/ rPGP9.5 der verschiedenen OP-Gruppen.
- Tabelle 14 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression des neuronalen Markers „PG P9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“, SC+GDNF-Gruppe.
- Tabelle 15 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression des neuronalen Markers „PG P9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“, SC-Gruppe.
- Tabelle16 Relative Quantifizierung der mRNA Expression des neuronalen Markers „PG P9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“, Trans-Gruppe.
- Tabelle 17 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression des neuronalen Markers „PG P9.5“ gegen den globalen Marker „GAPDH“, Kontroll-Gruppen.

Tabelle 18 Mittelwerte der PGP9.5/GAPDH Expression der verschiedenen OP-Gruppen.

Tabelle 19 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der nNOS gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC+GDNF-Gruppe.

Tabelle 20 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC-Gruppe.

Tabelle 21 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der Trans-Gruppe.

Tabelle 22 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression nNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“.

Tabelle 23 Zeigt die Mittelwerte der nNOS/GAPDH Expression der verschiedenen OP-Gruppen.

Tabelle 24 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der iNOS gegen den globalen Marker „GAPDH“.

Tabelle 25 Zeigt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression riNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, SC-Gruppe.

Tabelle 26 Zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression riNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, Trans-Gruppe.

Tabelle 27 Zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression riNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus den Kontroll-Gruppen.

Tabelle 28 Zeigt die Mittelwerte der iNOS/GAPDH Expression der verschiedenen OP-Gruppe.

Tabelle 29 Zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression der eNOS gegen den globalen Marker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC+GDNF-Gruppe.

Tabelle 30 Zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression reNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der SC-Gruppe.

Tabelle 31 Zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression reNOS gegen den globalen Gewebsmarker „GAPDH“, dabei zeigt die Tabelle die quantifizierten Tiere aus der Trans-Gruppe.

Tabelle 32 Zeigt die relative Quantifizierung der RNA-Expression reNOS gegen den globalen Gewebemarker „GAPDH“, Kontrollgruppe.

Tabelle 33 Zeigt die Mittelwerte der eNOS/GAPDH Expression der verschiedenen OP-Gruppen.

Tabelle 34 Gegenüberstellung von durch relat. Quantifizierung gewonnenem nNOS/PGP Expressionsverhältnis und intrakavernösem Maximaldruck [mmHg].

Tabelle 35 Signifikanzprüfung der relativen Quantifizierungen durch RT-PCR

10. Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei allen die die Fertigstellung dieser – meiner - Doktorarbeit ermöglicht haben.

Vielen Dank geht besonders an meine lieben Eltern, welche mich immer unterstützt haben.

Vielen Dank gilt auch PD Dr. med. Forian May für die langjährige Betreuung. Frau Dr.med.vet. Christiane Caspers und Thomas Mrva danke ich für die geduldige Einarbeitung.

Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Hartung danke ich für die Ermöglichung und Finanzierung.

Ich danke weiterhin sehr dem Team des Institutes für experimentelle Onkologie, sowie den Tierpflegern und Tierpflegerinnen. Vielen Dank auch an Frau Dr. rer. nat. Antonie Lehmer, Dr. med. Stefan Schöler und Frau Doris Langer. Michelle Klotz danke ich sehr für geduldigstes Korrekturlesen. Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe aus Regensburg. Danke an Dr. med. Norbert Weidner, Herrn Dipl. Biol. Maurice Vroemen. Dank gilt auch Prof. Gänsbacher, Prof. Erhardt. Frau Dipl.-Math. Raymonde Busch danke ich sehr für die statistische Beratung.

Vielen Dank auch Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend für die weitergeführte Betreuung meiner Doktorarbeit.

TISSUE ENGINEERING EREKTILER NERVEN

– UNTERSUCHUNGEN ZU FUNKTION UND EXPRESSION DER NOS ISOMERASEN –

Einleitung: Nach radikalen Prostatektomien kommt es aufgrund von Verletzungen bzw. Exzision der kavernösen Nerven häufig zu erektilen Dysfunktionen postoperativ. Bisherige Versuche die Erektionsfähigkeit wiederherzustellen, bedienten sich der autologen Nerventransplantation. Erfolgversprechender scheint, so in kürzlich durchgeführten Studien untersucht, die Verwendung von Silikonröhrchen, welche als Leitschienen beim Nervenwachstum dienen und mit Wachstumsfaktoren bzw. Schwann-Zellen angereichert werden können. Der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) kommt eine bedeutende Rolle in der Regeneration, sowie im Mechanismus des Erektionsvorganges zu. Ziel dieser Arbeit war es die Expression der drei NOS-Isomerasen bei Rekonstruktionsverfahren (autologe Nerven- transplantation, Tissue engineering) zu untersuchen. Weiterhin erfolgten funktionelle, sowie histologische Untersuchungen.

Methodik: Es erfolgten Untersuchungen am Rattenmodell. Nach Teilexzision des Nervus cavernosus bilateral wurde zum einen versucht die Nervenkontinuität durch autologe Nerventransplantate, zum anderen durch Silikonröhrchen, welche als artefizielle Nervenleitschienen dienen, wiederherzustellen. Um die Nervenregeneration zu fördern wurden Schwann-Zellen (SC) und GDNF-überexprimierende SC in die Silikonröhrchen eingebracht. Nach einem Intervall von ca. 7 Wochen erfolgten bei Relaparotomie Funktionsmessungen und Gewebeentnahmen zur histologischen Untersuchung, sowie die Bestimmung der NOS-Expression mittels quantitativer PCR.

Ergebnisse: Bei Tieren, bei denen eine Wiederherstellung der Nervenkontinuität mit Hilfe artefizieller Leitschienen erfolgte, zeigten sich signifikant bessere Ergebnisse bezüglich dem intrakavernösem Druck nach Stimulation im Vergleich zu Tieren, welche eine autologe Nerventransplantation zur Überbrückung des Defektes erhalten hatten. Die besten funktionellen Ergebnisse zeigten sich bei Tieren mit GDNF-überexprimierenden SC. Bei diesen Tieren konnte neben der Überlegenheit in der Funktionalität auch eine signifikant höhere nNOS-Expression im Nervengewebe des Schwellkörpers festgestellt werden. Bei Tieren mit bilateraler Nervenexzision, welche als Negativkontrolle dienten, zeigte sich neben einem kompletten Funktionsverlust auch eine signifikant erniedrigte nNOS-Expression.

Bezüglich der zwei anderen NOS-Isomerasen (iNOS, eNOS) ließen sich dagegen keine Signifikanzen feststellen.

Schlussfolgerung: In unseren Versuchen zeigte sich, dass die Expression der neuronalen NOS (nNOS) signifikant mit einer erfolgreichen Nervenregeneration korreliert. In Geweben in welchen eine ausreichende Expression der nNOS mit Hilfe von Rekonstruktionsversuchen gewährleistet ist, erfolgte eine gute Regeneration. Neben der Regeneration, welche histologisch nachgewiesen werden konnte, zeigten sich gute funktionelle Ergebnisse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen die Möglichkeit neuer Therapieformen bei erektiler Dysfunktion nach radikaler Prostatektomie, so könnte eine z.B. durch Gentherapie artefizielle Steigerung der nNOS-Expression zu einer Verbesserung der Regeneration führen.