

**Strukturelle Blasenveränderungen bei neurogenen
Blasenfunktionsstörungen nach Therapie mit Botulinumtoxin Typ A**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von

Ulf Kregel

aus Bonn

2006

Angefertigt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan C. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Wernert

Tag der mündlichen Prüfung : 24.04.2006

Aus der Urologischen Klinik der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan C. Müller

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meiner Mutter, meinen Geschwistern und Verena

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis:	7
2. Einleitung	8
2.1. Definition	8
2.2. Anatomie und Physiologie der Blase	8
2.2.1. Muskulatur	8
2.2.2. Nervale Versorgung	8
2.2.3. Ablauf der Miktion.....	11
2.3. Klassifikation und Ursachen neurogener Blasenfunktionsstörungen	11
2.4. Pathophysiologie der neurogenen Blasenfunktionsstörungen	12
2.5. Ultrastrukturelle Grundlagen bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen	13
2.6. Komplikationen neurogener Blasenfunktionsstörungen	15
2.7. Therapie neurogener Blasenfunktionsstörungen.....	16
2.8. Botulinumtoxin Typ A zur Behandlung von Detrusorhyperreflexie	18
2.9. Fragestellung der Arbeit.....	19
3. Material und Methodik	20
3.1. Material	20
3.1.1. Patienten.....	20
3.1.1.1. Klinische Untersuchungen der Patienten	20
3.1.1.2. Gewebeentnahme und Aufarbeitung der Proben	22
3.1.2. verwendete Materialien.....	23
3.1.3. verwendete Geräte.....	24
3.2. Methodik	25
3.2.1. Einführung.....	25
3.2.2. Einbettung und Färbung der Biopsien.....	25
3.2.3. Photographie und Entwicklung.....	30
3.2.4. Ultrastrukturelle Auswertung.....	30
3.2.4.1. Muskelzellen und Interstitium.....	31
3.2.4.2. Nervenzellen	33
3.3. Fragestellung	36
3.4. Statistik.....	36

4. Ergebnisse	37
4.1. Urodynamik.....	37
4.2. Ultrastruktur der glatten Blasenmuskulatur	37
4.2.1. Struktur der Muskelfazikel.....	38
4.2.2. Muskelzellverbindungen: ultrastrukturelles Dysjunction Muster.....	38
4.2.3. Muskelzelldegeneration	39
4.3. Ultrastruktur der Nerven	40
4.3.1. Axonale Degeneration.....	41
4.3.2. Axonale Regeneration.....	42
4.3.3. Aktivierte Schwann`sche Zellen	43
5. Diskussion	44
5.1. Beurteilung der urodynamischen Ergebnisse.....	44
5.2. Beurteilung der ultrastrukturellen Ergebnisse der Muskulatur	45
5.3. Beurteilung der ultrastrukturellen Ergebnisse der Nerven.....	46
5.4. Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten	48
5.5. Fazit.....	50
6. Zusammenfassung	51
7. Bildanhang	53
7.1. Muskelzellen und Degeneration.....	53
7.2. Muskelzellverbindungen	60
7.3. Nervenzellen und Schwann`sche Zellen	71
8. Literaturverzeichnis	90
9. Danksagung	102
10. Lebenslauf	103

1. Abkürzungsverzeichnis:

ANOVA	ANalysis Of VAriance between groups
ASIA	American Spinal Injury Association
BOO	Blasenauslassobstruktion (bladder outlet obstruction)
CA	Close Appositions
CDP	Complete Dysjunction Pattern
DO	Detrusorinstabilität (detrusor overactivity)
DSD	Detrusor-Sphincter-Dyssynergie (detrusor sphincter dysynergy)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
ICA	Intimate Cell Appositions
ICS	International Continence Society
IDC	Verminderte Detrusorkontraktilität (impaired detrusor contractility)
IDJP	Incomplete Dysjunction Pattern
IJ	Intermediate cell junctions
Inj.	Injektion
Kv	Kilovolt
LDCV	Elektronendichte Vesikel (large dense core vesicles)
max.	Maximal
MC	Muskelzelle (muscle cell)
MIN	Muskel-Interstitium-Nerven (muscle interstitium nerves)
min.	Minute/n
ml	Milliliter
MMC	Meningomyelozele
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
SCI	Rückenmarksverletzung (spinal cord injury)
SV	Kleine Vesikel (small vesicles)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

2. Einleitung

2.1. Definition

Als neurogene Blasenfunktionsstörungen werden alle Störungen der physiologischen Speicher- und Entleerungsfunktion des unteren Harntraktes bezeichnet, die infolge von Erkrankungen des zentralen, spinalen oder peripheren Nervensystems auftreten. (Alken und Walz, 1992a; Wetterhauer et al., 1995).

2.2. Anatomie und Physiologie der Blase

Zum Verständnis der komplexen Vorgänge während der Miktion und deren Störungen ist es notwendig, die Anatomie und Physiologie des unteren Harntraktes genauer zu betrachten. Die Blase dient als Speicherorgan für den Urin, wobei zwischen einer Speicherphase (23,5 h pro Tag) und einer Entleerungsphase (0,5 h pro Tag) unterschieden wird (Hauri und Jaeger, 2000). Um diesen Ablauf zu ermöglichen, sind verschiedene Strukturen und Vorgänge nötig.

2.2.1. Muskulatur

Der Detrusormuskel dient als Speicher und besitzt bei Kontraktion eine Pumpfunktion. Der untere Anteil stellt die Basis eines komplexen Verschlussmechanismus dar (Elbadawi, 1996). Desweiteren wird der Harnfluss durch den Musculus sphincter urethrae internus und externus sowie die Beckenbodenmuskulatur reguliert (Trepel, 1999).

2.2.2. Nervale Versorgung

Die nervale Versorgung wird über das autonome Nervensystem mittels Parasympathikus und Sympathikus und zu einem geringen Teil durch das somatische Nervensystem gesteuert. Das somatische Nervensystem beeinflusst jedoch nur die Funktion des Musculus sphincter externus und der Beckenbodenmuskulatur (De Groat, 1997; Elbadawi, 1983; Stöhrer, 2003). Sowohl das autonome als auch das somatische Nervensystem wird von übergeordneten supraspinalen Zentren beeinflusst und enthält jeweils einen afferenten und einen efferenten Schenkel (Elbadawi, 1996; Yoshimura und De Groat, 1997).

Ausgehend von parasympathischen Kerngebieten im Sakralmark in Höhe des spinalen Miktionszentrums S2-S4 ziehen präganglionäre parasympathische Fasern durch die Vorderwurzeln über den Nervus pelvicus zum Detrusor (Elbadawi, 1996). Die Umschaltung auf postganglionäre Fasern erfolgt entweder im Plexus pelvicus oder in intramuralen Ganglien innerhalb der Blasenwand (de Groat, 1997). Impulse dieser Nerven führen letztendlich durch Acetylcholinfreisetzung über muskarinerge Rezeptoren zur Kontraktion des Detrusors und Hemmung der urethralen Muskulatur und somit Miktion (Brindley und Craggs, 1976; de Groat, 1997; Kinder und Mundy, 1985). Dabei findet sowohl eine Modulation der intramuralen Ganglien durch verschiedene muskarinerge, adrenerge, purinerge und peptiderge Rezeptoren im präganglionären Bereich als auch eine Kontrolle der Acetylcholinausschüttung durch präsynaptische Hemmung über muskarinerge (M1) Autorezeptoren im postganglionären Bereich statt (de Groat, 1997).

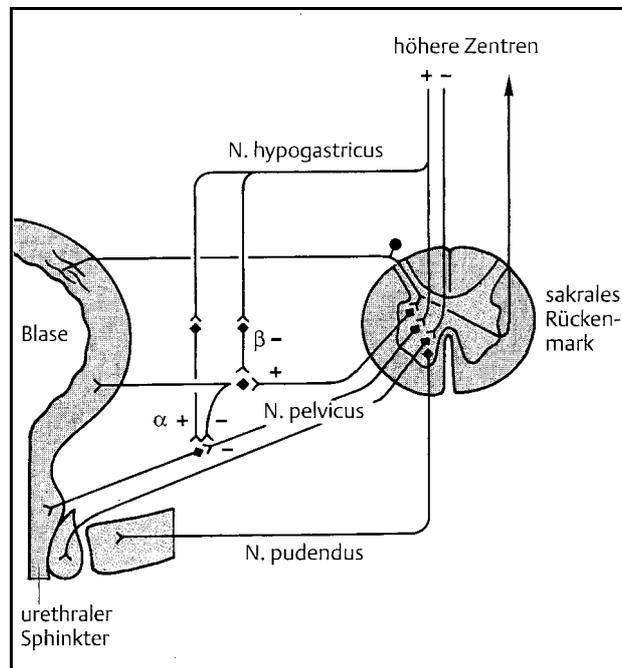


Abbildung 1: Organisation der vegetativen Innervation zwischen Rückenmark und unterem Harntrakt

Bei einer Läsion unterhalb des spinalen Miktionszentrums S2-S4 oder in der Peripherie, spricht man von einer infranukleären, oberhalb davon von einer supranukleären Läsion.

Die sympathische Versorgung des Detrusors und des Musculus sphincter internus erfolgt ausgehend von Kerngebieten im Bereich Th10-L2 (Elbadawi, 1996). Von dort ausgehende Fasern ziehen nach Umschaltung im Grenzstrang über den Nervus hypogastricus und den Plexus pelvicus zum Detrusor und Musculus sphincter internus. Sie bewirken dort über eine Noradrenalinfreisetzung eine Relaxation des Detrusors und der Urethra (α_2 , β) bzw. Stimulation des Musculus sphincter internus (α_1) und somit Speicherung des Urins (de Groat, 1997; Elbadawi, 1996).

Der quergestreifte Musculus sphincter externus sowie die Beckenbodenmuskulatur werden durch den Nervus pudendus, ausgehend von S2-S4, innerviert und ermöglichen eine willkürliche Beeinflussung des Miktionsvorganges (de Groat, 1997; Trepel, 1999).

Das auf Rückenmarksebene operierende System von Sympathikus und Parasympathikus wird durch das übergeordnete pontine Miktionszentrum in der *Formatio reticularis* und dieses wiederum durch höhere Zentren wie Hypothalamus, frontales Blasenzentrum und Basalganglien kontrolliert (Trepel, 1999). Eindrücke vom Füllungsstand der Blase gelangen über kleine myelinisierte A- δ und marklose C-Fasern als Afferenzen zum ZNS, die Informationen von Dehnungs- und Nozizeptoren aus der Blasenwand übertragen (de Groat, 1997). Diese Fasern verlaufen mit dem Nervus pelvicus ins Sakralmark und geben den Impuls, die Miktion zu beginnen (de Groat, 1997). Durch die übergeordneten Zentren findet weitestgehend eine Hemmung und somit Erhaltung der Kontinenz statt (Trepel, 1999). Liegt nun eine Läsion der spinalen Bahnen vor, so kommt es zu einer autonomen Regulation durch das spinale Miktionszentrum (Stöhrer, 2003; Tanagho und Schmidt, 1992).

2.2.3. Ablauf der Miktion

Bei zunehmender Füllung der Blase erfolgt mit ansteigender Wandspannung über afferente Bahnen eine Aktivierung des Parasympathikus. Sofern nicht durch übergeordnete Zentren gehemmt, bewirkt diese wiederum eine Detrusorkontraktion und Sphinctererschaffung und somit die Miktion (Trepel, 1999).

2.3. Klassifikation und Ursachen neurogener Blasenfunktionsstörungen

Aufgrund der Komplexität und des ständig wachsenden Wissensstandes bestehen eine Fülle von Klassifikationen der neurogenen Blasenfunktionsstörungen. Die Störungen im Bereich des unteren Harntraktes lassen sich anhand der Standards der International Continence Society (ICS) klinisch nachweisen und mit dem neurologisch ausgerichteten System von Bors und Comarr gut einordnen (Abrams et al., 1988; Bors und Comarr, 1971). Je nach dem Ort der Schädigung spricht man von lower und upper motor neuron lesions bzw. infra- und supranukleärer Läsion (Alken und Walz, 1992b). Anhand der Klinik, der Funktion und den videourodynamischen Untersuchungen werden folgende Gruppen unterschieden:

- 1. supranukleäre Läsion mit Detrusorhyperreflexie und spastischem Beckenboden
- 2. supranukleäre Läsion mit Detrusorhyperreflexie und schlaffem Beckenboden
- 3. infranukleäre Läsion mit Detrusorareflexie und spastischem Beckenboden
- 4. infranukleäre Läsion mit Detrusorareflexie und schlaffem Beckenboden

Eine supranukleäre Läsion kann somit eine Reflexinkontinenz verursachen, eine infranukleäre Läsion eine schlaffen Blase (Hauri und Jaeger, 2000).

Die Ursachen für eine solche Störung können entweder angeboren oder erworben sein.

Zu den angeborenen Störungen zählen insbesondere alle Formen der Myelodysplasie wie Myelomenigozele, Sakralagnesie und Spina bifida occulta, die sich zu einem großen Teil im lumbo-sakralen Bereich und damit am spinalen Miktionszentrum befinden (Roth et al., 1993). Diese stellen mit einer Inzidenz von ein bis drei auf 1000 Lebendgeburten die wichtigsten Ursachen der kindlichen neurogenen Blasenfunktionsstörung dar (Bloom, 1997).

Zu den erworbenen Störungen zählen entzündliche und degenerative Erkrankungen (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose und Encephalomyelitis), Durchblutungsstörungen (Infarkte, Zerebralsklerose), raumfordernde Prozesse (Malignome, Syringomyelie), Stoffwechselerkrankungen (Diabetes mellitus), iatrogene (operative Eingriffe, Radiatio und Medikamente) sowie Traumata (Schädel-Hirn Trauma, Querschnittslähmung) (Hauri und Jaeger, 2000; Stöhrer et al., 1997c). Dabei stellen Unfälle mit traumatischer Querschnittslähmung die Hauptursache der erworbenen Störungen dar. So erkranken in Deutschland jedes Jahr 1300-1500 Menschen neu an einer Querschnittslähmung und damit verbunden in einer Vielzahl der Fälle ebenfalls an einer neurogenen Blasenfunktionsstörung (Delank und Gehlen, 1999; Spahn und Gerner, 2002). Hierbei liegen die Rückenmarksläsionen zu 85% oberhalb oder im Bereich Th12 (Watanabe et al., 1996).

2.4. Pathophysiologie der neurogenen Blasenfunktionsstörungen

Nach einem Rückenmarkstrauma entsteht zunächst der Zustand des spinalen Schockes, währenddessen es zu einer Lähmung des Detrusors und zu einem Versiegen der Reflexe unterhalb der Läsion kommt. Diese Phase ist in ihre Länge sehr variabel und dauert im Durchschnitt zwei Wochen bis drei Monate (Watanabe et al., 1996). Während des spinalen Schockes ist der Detrusor schlaff und es entwickelt sich eine Überlaufblase (Tanagho und Schmidt, 1992; Watanabe et al., 1996). In dieser Phase besteht die Gefahr der unbemerkten Überdehnung und damit irreversiblen Zerstörung des intramuralen Nervenplexus (Alken und Walz, 1992b).

Es folgt die Erholungsphase, in der es zu einem Auftreten von Reflexen kommt und sich, je nach Ort der Schädigung, ein bestimmtes Muster der Störung entwickelt (Watanabe et al., 1996). So kommt es bei einer supranukleären Läsion aufgrund des Fehlens der zerebralen Kontrolle des sakralen Reflexbogens zu einer hyperreflexiven Blase und damit zu herabgesetzter Blasenkapazität, erhöhtem intravesikalem Druck und unwillkürlichen Blasenkontraktionen (Sökeland und Rübben, 1993; Watanabe et al., 1996). Ferner besteht oftmals eine Detrusor-Sphincter-Dyssynergie, die zur Erhöhung des intravesikalen Druckes beiträgt (de Groat et al., 1997; Watanabe et al., 1996). Bei einer infranukleären Läsion dagegen entwickelt sich aufgrund fehlender Innervation eine Detrusorareflexie mit einer erhöhten Blasenkapazität, niedrigem

intravesikalem Druck und fehlenden Blasenkontraktionen (Sökeland und Rübber, 1993; Watanabe et al., 1996).

Wenn sich keinerlei Besserung der neurologischen Symptome mehr zeigt und sich ein stabiles urodynamisches Muster entwickelt hat, ist die letzte, sogenannte stabile Phase erreicht (Watanabe et al., 1996).

2.5. Ultrastrukturelle Grundlagen bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen

Ausgehend von einem gesunden Detrusor sind für den erfolgreichen Ablauf der Miktion folgende Faktoren und ihre strukturellen Korrelate wichtig: Die Stimulation, die durch die intrinsischen Axone und die muskulären Endplatten repräsentiert wird. Die Kraftentwicklung, welche von Blutversorgung und Beschaffenheit der Muskelzellen abhängt. Sowie die Koordination des Vorganges, die durch ein Zusammenspiel von Muskelzellen und Interstitium geregelt wird (Elbadawi, 1991).

Bisher sind gewisse ultrastrukturelle Gewebeveränderungen des M. Detrusor bei verschiedenen Formen von Blasenfunktionsstörungen anhand eines geriatrischen Patientenkollektives festgestellt und als deren strukturelle Basis beschrieben worden (Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 1997). Es wurden drei verschiedene ultrastrukturelle Muster beschrieben, die entweder einzeln oder in Kombination auftreten:

1. "Full degeneration pattern"

Eine verminderte Kontraktilität des M. Detrusor kennzeichnete sich ultrastrukturell durch eine sehr ausgeprägte Degeneration von Muskelzellen und intrinsischen Axonen (Elbadawi et al., 1993b; Hailemariam et al., 1997).

2. "Myohypertrophy pattern"

Eine urodynamisch verifizierte Blasenauflassobstruktion (BOO) korrelierte ultrastrukturell mit Muskelzellhypertrophie und erweiterten Interzellularräumen, sowie einem erhöhten Gehalt an kollagenen Fasern (Elbadawi et al., 1993d).

3. "Complete dysjunction pattern"

Das Vorkommen von geriatrischer und obstruktiver Detrusorinstabilität (DO) wurde mit Veränderungen der Muskelzellverbindungen in Zusammenhang gebracht (Elbadawi et al., 1993c; Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 1997; Hailemariam et al., 1997). Im gesunden Detrusor ohne Blasendysfunktion dominieren Intermediate Cell Junctions (IJ) (Abb. 10-13). Diese leiten die Kontraktion einer Muskelzelle mechanisch auf ihre Nachbarzelle weiter (Elbadawi, 1996). Eine

Intermediate Cell Junction besteht aus streng parallel verlaufenden Zellmembranen mit gepaarten, symmetrischen, elektronenmikroskopisch dichten, submembranösen Plaques. Diese beiden Zellmembranen sind durch einen 25-60 nm breiten Interzellulärspalt voneinander getrennt, der eine zentrale lineare Verdichtung enthält.

Beim instabilem Detrusor kommt ein typisches ultrastrukturelles Muster vor, das im wesentlichen aus drei Komponenten besteht (Elbadawi et al., 1993c; Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 1997; Hailemariam et al., 1997). Dies sind erstens eine Verminderung bis hin zur völligen Abnahme der Intermediate Cell Junctions. Zweitens eine Dominanz oder ein fast ausschließliches Vorkommen von neuen Zellverbindungen, die sich durch einen sehr engen Interzellulärspalt auszeichnen und als „protrusion junctions“ und „ultra-close abutments“ bezeichnet werden (Abb. 14-20). Drittens eine kettenartige Verbindung (chain like linkage) von fünf oder mehr Muskelzellen (Abb.9) durch diese engen Muskelzellverbindungen (Elbadawi et al., 1993c; Elbadawi et al., 1997; Hailemariam et al., 1997). Die Interzellulärspalten, die bei diesen neuen Zellverbindungen zwischen den benachbarten Muskelzellen auftreten, sind mit einem Abstand von 6-12 nm sehr eng. Daher wurde postuliert, sie bildeten die myogene Basis für die unwillkürlich auftretenden Kontraktionen während der Füllungsphase der Blase (Detrusorsinstabilität) und bewirkten eine elektrische Kopplung zwischen den einzelnen Muskelzellen (Elbadawi, 1997).

4. „Dense Band Pattern“

Dieses weitere Muster, das sich ultrastrukturell durch ein Fehlen oder eine Reduktion von sonst vorhandenen Caveolae im Sarkoplasma nahe der Muskelzellmembran und eine Elongation der beteiligten submembranösen Verdichtungen auszeichnet, wurde als typisches Merkmal des geriatrischen Detrusors identifiziert. Dabei trat es sowohl bei geriatrischen Patienten mit als auch bei Patienten ohne Blasenfunktionsstörung auf (Elbadawi et al., 1997).

Bis heute konnten intrinsische strukturelle Defekte bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen erstmals und ausschließlich anhand von Untersuchungen an einem feline experimentellen Modell mit einer Schädigung des unteren Motorneurons beschrieben werden. Es wurden an einer durch sakrale ventrale Rhizotomie völlig dezentralisierten Harnblase ultrastrukturelle Veränderungen beobachtet, die durch kurzfristige Degeneration (drei Wochen), gefolgt von einer langfristigen Regeneration (zehn Wochen) gekennzeichnet waren. Dabei stellten nach Angaben der Autoren diese ultrastrukturellen Veränderungen die strukturelle Grundlage der Blasenfunktionsstörung bei Schädigung oder Defizit des präganglionären unteren Motorneurons

dar (Atta et al., 1984; Elbadawi et al., 1984; Elbadawi und Atta, 1984). Die Degeneration der intrinsischen Nerven wurde als transsynaptisch (transneuronal) identifiziert, da Axone von anatomisch intakten postganglionären Neuronen betroffen waren. Diese waren über ein oder mehrere synaptische Relais entlang der Nervenbahn zur Blase von dem geschädigten präganglionären Axon entfernt (Elbadawi et al., 1984). Modelle einer peripheren (postganglionären) Neurektomie der felines Blase durch eine Exstirpation des Plexus pelvici ergaben ultrastrukturelle Veränderungen im Sinne einer persistierenden Degeneration mit minimaler Regeneration der intrinsischen Nerven (Elbadawi et al., 1988).

2.6. Komplikationen neurogener Blasenfunktionsstörungen

Unbehandelt führt die neurogene Blasenfunktionsstörung kurzfristig zu einer herabgesetzten Lebensqualität infolge von Inkontinenz. Mittel- und langfristig jedoch stehen lebensbedrohliche Funktionsstörungen im Vordergrund (Schurch, 2000). Die Hauptkomplikationen der neurogenen Blasenfunktionsstörungen ergeben sich aus dem erhöhten intravesikalen Druck. So kann es durch eine Steigerung des intravesikalen Druckes auf über 40 cmH₂O zu einem vesiko-ureteralen Reflux kommen (McGuire et al., 1983). Durch Übertragung dieses erhöhten Druckes auf die Ureteren und Nieren kann sich eine Hydronephrose entwickeln. Dies kann langfristig zu einer Degeneration der Tubuli und einer Niereninsuffizienz führen (McGuire et al., 1997; Rübben, 1993b). Desweiteren kommt es infolge von Detrusor-Sphincter-Dyssynergie zur Restharnbildung. Dies wiederum begünstigt das Auftreten von Blasensteinen und Infektionen der Blase (Alken und Radler, 1998; Rübben, 1993a). Die rezidivierenden Harnwegsinfekte gehören zu den häufigsten Komplikationen der neurogenen Blasenfunktionsstörungen (Tanagho und Schmidt, 1992). Weiterhin kann es durch den vesiko-ureteralen Reflux zu einer Keimaszension und damit zu einer Pyelonephritis kommen. Diese schränkt dann die ohnehin schlechte Nierenfunktion zusätzlich ein und kann zur Urosepsis und zum Tode führen (Barber und Cross, 1952; Grundy et al., 1982; Nizze und Kerjaschki, 2001).

Noch gegen Ende des zweiten Weltkrieges starben an Querschnittslähmung erkrankte Soldaten aufgrund der urologischen Komplikationen durchschnittlich innerhalb von zwei bis drei Jahren (Schurch, 2000). Die Lebenserwartung hängt somit wesentlich von der sachgerechten Behandlung der Erkrankten ab (Sökeland und Rübben, 1993).

2.7. Therapie neurogener Blasenfunktionsstörungen

Um langfristig entstehende Schäden zu vermeiden oder zu minimieren ist eine frühzeitige und adäquate Therapie der neurogenen Blasenfunktionsstörungen unbedingt notwendig. Dies gilt insbesondere für Kinder. Da die geschädigten Neurone des Rückenmarkes keine Regenerationsfunktion besitzen, ist eine kausale Therapie zur Zeit noch nicht möglich (Blomjous et al., 1988; Junqueira und Carneiro, 1996). Tierexperimentelle Erfolge, in denen eine teilweise anatomische und funktionelle Nervenregeneration in Ratten nachgewiesen wurde, lassen auf eine derartige Therapieoption hoffen (Bregman et al., 1995; Schwab, 1990; Zhou et al., 2003). Eine klinisch relevante Anwendung der Ergebnisse dieser Studien für den Menschen besteht jedoch noch nicht.

Die Aufrechterhaltung eines Niederdrucksystems mit möglichst physiologischer Compliance, Kontinenz und druckfreie, komplette Blasenentleerung sind die Ziele der Therapie bei neurogener Blasenfunktionsstörung (Burgdörfer et al., 1998; Stöhrer, 2003).

In der Phase des spinalen Schocks ist eine sofortige Sicherstellung der Blasenentleerung durch Dauerableitung mittels Dauerkatheter oder suprapubischer Blasenpunktionsfistel bis zum Vorliegen einer geregelten Diurese und Urinbilanz notwendig (Burgdörfer et al., 1998; Schurch, 2000). Die druckfreie, komplette Entleerung der Blase wird sowohl bei Detrusorhyperreflexie als auch bei Detrusorareflexie durch den von Lapedes eingeführten (Lapedes et al., 1972), vier bis fünfmal täglichen intermittierenden Selbstkatherismus erreicht (Burgdörfer et al., 1998; Guttmann und Frankel, 1966; Stöhrer et al., 1997a). Die früher angewandten Techniken der Triggerung, der Bauchpresse und Credè zum Auslösen der Miktion sind aufgrund der auftretenden hohen Drücke und damit verbundenen Schädigung des oberen Harntraktes verlassen worden (Stöhrer et al., 1997b).

Die insbesondere bei Detrusorhyperreflexie auftretenden hohen intravesikalen Drücke werden heute in der Regel durch Anticholinergika behandelt (Abrams et al., 1999). Angewandte Arzneimittel sind Oxybutyninchlorid (Dridase®), Tolterodin (Detrusitol®), Propiverin (Miktonorm®) und Trosipiumchlorid (Spasmex®) (Stöhrer et al., 1997b; Stöhrer, 2003). Oftmals auftretende Nebenwirkungen dieser Therapie sind jedoch Mundtrockenheit, Tachykardie, Sehstörungen und eine verminderte Darmperistaltik (Karow, 2001). Die Ansäuerung des Urins als Prophylaxe vor Harnwegsinfektionen ist eine mögliche Begleittherapie (Stöhrer et al., 1997b). Eine weitere Möglichkeit der medikamentösen Therapie ist die intravesikale Applikation von Capsaicin oder Resiniferatoxin, die sich zur Behandlung der Detrusorüberaktivität nach

Querschnittslähmung oder bei Multipler Sklerose als effektiv erwiesen hat (Cruz, 1998; Fowler et al., 1994; Maggi, 1992). Diese Substanzen bewirken durch eine temporäre Zerstörung von afferenten marklosen C-Fasern und myelinisierten A- δ Fasern eine Relaxierung des Detrusors (Chancellor und de Groat, 1999; De Groat et al., 1997; Fowler, 2000). Jedoch treten auch bei dieser Therapie Nebenwirkungen auf. Außerdem sprechen einige Patienten nicht darauf an (Chancellor, 1997; De Ridder et al., 1997; de Seze et al., 1998).

Sind diese konservativen Maßnahmen nicht ausreichend, so kann eine operative Therapie notwendig werden. Diese schließt unter anderem die suprapubische Harnableitung sowie, bei hyperreflexiven Blasen, eventuell eine sakrale Deafferentierung und Vorderwurzelstimulation ein (Alken und Walz, 1992b; Burgdörfer et al., 1998; Madersbacher et al., 1988; Schurch, 2000). Bei Patienten mit Low-Compliance Blasen werden Verfahren der Augmentation angewandt (Burgdörfer et al., 1998; Hautmann und Huland, 2001; Stöhrer, 2003).

Da alle operativen Verfahren ein erhöhtes Komplikationsrisiko für den Patienten bergen, sollte zunächst eine konservative Therapie angestrebt werden. In einigen Fällen ist jedoch bisher die operative Therapie die einzige Therapieoption, so dass nach weiteren weniger invasiven Methoden geforscht werden muss.

Eine weitere Alternative der Therapie besteht in der jüngst von Schurch (Schurch et al., 2000) und Stöhrer (Stöhrer et al., 1999) beschriebenen Injektion von Botulinumtoxin Typ A in den Detrusor bei hyperreflexiven Blasen infolge Querschnittslähmung. Dies soll im folgenden näher erläutert werden.

2.8. Botulinumtoxin Typ A zur Behandlung von Detrusorhyperreflexie

Die Wirkungsweise von Botulinumtoxin Typ A besteht in einer selektiven Hemmung der Exozytose von acetylcholinhaltigen Vesikeln an der präsynaptischen Membran und somit in einer Verhinderung der Acetylcholinausschüttung (Kao et al., 1976). Dies führt zu einer schlaffen Lähmung der Muskulatur (Karow, 2001; Schulte-Baukloh et al., 2002).

Botulinumtoxin Typ A wird seit langem zur Behandlung von chronischen Spastiken der quergestreiften Muskulatur wie essentiellm Blepharospasmus, Torticollis spasticus und verschiedenen Dystonieformen eingesetzt (Bhakta et al., 1995; Borodic und Ferrante, 1992; Simpson, 2000). Weiterhin konnten aber auch pathologische Kontraktionen der glatten Muskulatur wie Achalasie und autonome parasymphatische Störungen wie palmare Hyperhydrose oder gustatorisches Schwitzen durch den Einsatz von Botulinumtoxin Typ A erfolgreich behandelt werden (Naumann et al., 1997a; Naumann et al., 1997b; Pasricha et al., 1996).

Der Einsatz in der Urologie beschränkte sich bisher auf die Behandlung von Detrusor-Sphincter Dyssynergien, Urinretention und chronischen Prostataschmerzen (Leippold et al., 2003).

Zusätzlich zeigten Schurch et al. erstmals, dass eine Menge von 300 Einheiten Botulinumtoxin Typ A, das an 20-30 verschiedenen Stellen endoskopisch in den Detrusor eingebracht wurde, zu einer schlaffen Lähmung der Blase und damit zu einem Niederdruckreservoir führt (Schurch et al., 2000). Diese Veränderungen hielten mindestens für neun Monate an (Schurch et al., 2000). Seither konnten einige Autoren den Erfolg dieser neuen Therapiemethode zur Behandlung der Detrusorhyperreflexie bestätigen, bewerteten ihn aber maßgeblich anhand klinischer und urodynamischer Daten (Reitz et al., 2004a; Schulte-Baukloh et al., 2002; Schulte-Baukloh et al., 2003).

2.9. Fragestellung der Arbeit

Die Therapie der Detrusorüberaktivität bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen mittels Botulinumtoxin Typ A Injektionen wird mehr und mehr klinisch akzeptiert und angewandt (Leippold et al., 2003; Reitz et al., 2004a). Ergebnisse über strukturelle Veränderungen nach Botulinumtoxin Typ A Injektionen liegen aus Studien im quergestreiften Musculus orbicularis oculi vor. Dort konnten während der Phase der Denervation reichlich aussprossende Axone nachgewiesen werden (Holds et al., 1990). Im mit Botulinumtoxin Typ A behandelten quergestreiften Musculus sternocleidomastoideus der Maus konnten ebenfalls aussprossende Axone beobachtet werden. Diese übernahmen für die Zeit der Denervation sogar teilweise die Funktion der ursprünglichen Axone und verschwanden mit Nachlassen der Toxinwirkung wieder (de Paiva et al., 1999) . Außerdem stellen wiederholte Injektionen von Botulinumtoxin Typ A Mikrotraumen dar, die zu Vernarbungen mit einem Anstieg des Kollagengehaltes der Blase und damit verminderter Compliance führen könnten. Bisher liegen jedoch keine Studien vor, welche die Ultrastruktur des menschlichen Detrusors im Verlauf dieser Therapie analysiert und eventuell entstandene Veränderungen bemerkt haben.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es deshalb folgende Fragen zu untersuchen:

- 1. Treten ultrastrukturelle neuromuskuläre Veränderungen im Detrusor nach Botulinumtoxin Typ A Injektion zur Behandlung von Detrusorüberaktivität bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen auf ?
- 2. Kann die Wirksamkeit dieser Therapiemethode zur Behandlung der Detrusorüberaktivität bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen wie in bereits vorhandenen Studien bestätigt werden ?

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Patienten

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus elf Frauen und 13 Männern im Alter von 13 bis 77 Jahren (Durchschnittsalter 30 Jahre). Alle Patienten wurden aufgrund einer neurogenen Blasenfunktionsstörung mit Detrusorüberaktivität mittels Botulinumtoxin Typ A Injektionen in den Detrusor behandelt. Dabei bestand die neurogene Blasenfunktionsstörung der Patienten zwischen sieben Monaten und 36 Jahren aufgrund folgender Ursachen: 19 Patienten erlitten eine Rückenmarksverletzung mit Querschnittslähmung, drei hatten eine Meningomyelozele, sowie je ein Patient eine Myelitis und eine idiopathische Durchblutungsstörung des Rückenmarkes.

		Patientenkollektiv	
Anzahl	Alter	24	13–77 Jahre
Krankheitsdauer		7–36 Monate/Jahre	
Rückenmarksverletzung		19	
Meningomyelozele		3	
Myelitis		1	
Ischämie		1	
ASIA A		8	
ASIA B, C, D		16	

Tabelle 1: Darstellung des Patientenkollektives

3.1.1.1. Klinische Untersuchungen der Patienten

Die klinische Untersuchung der Patienten fand in Bonn, Murnau und in Zürich (Schweiz) statt. Es wurde eine neurologische Untersuchung, sowie ein Computertomogramm oder Magnetresonanztomogramm der Wirbelsäule durchgeführt. Diese wurde zum Teil durch andere neurophysiologische Studien ergänzt. Die anatomische Schwere der Rückenmarksverletzung wurde anhand der revidierten ASIA Klassifikation von 1997 (vollständig/unvollständig) erfasst (Maynard, Jr. et al., 1997). Drei Patienten hatten cervikale, 16 thorakale und fünf lumbale Läsionen. Acht Patienten litten unter einer kompletten (ASIA A) und 16 unter einer inkompletten (ASIA B, C, oder D) Läsion. Alle Patienten befanden sich in einem stabilen Zustand der neurogenen Blasenfunktionsstörung nach Erholung vom spinalen Schock (Watanabe et al., 1996). Patienten mit Demenz, multipler Sklerose, Parkinson, Diabetes mellitus, Prostata oder

Blasenkrebs, sowie Blasenkateter wurden nicht in die Studie aufgenommen. Zur Bestätigung der neurogenen Blasenfunktionsstörung und einer Detrusorüberaktivität wurden bei allen Patienten videourodynamische Untersuchungen nach den Standards der International Continence Society (Abrams et al., 1988; Schäfer et al., 2002) sowie nach einem schon entwickelten Standardprotokoll durchgeführt (Elbadawi et al., 1993a; Elbadawi et al., 1997). Alle Patienten erhielten eine Füllungszystometrie mit langsamer bis mittelschneller Füllung (abhängig von der Blasenreaktion auf die Füllung), ein gleichzeitiges Beckenbodenelektromyogramm mit rektaler Sonde sowie eine Bestimmung des Blasensphincteröffnungsdruckes. Die Füllgeschwindigkeit der Harnblase betrug dabei 1/5 des Körpergewichtes in kg in ml/min., max. jedoch 20 ml/min. Als Füllmedium wurde Röntgenkontrastmittel mit einer Temperatur von 37°C verwandt. Ferner wurde ein Druckprofil der Urethra erstellt sowie eine Uroflowmetrie, durchgeführt. Die Compliance der Blase ($\Delta V/\Delta p_{det}$) wurde bei allen Patienten gemessen und zwar während der Füllung der Blase im Bereich der fünf bis zehn Sekunden vor Beginn der Detrusoraktivität (Sullivan und Yalla, 1996). Dies wurde sowohl vor als auch sechs Wochen bis drei Monate nach Injektion von Botulinumtoxin Typ A und jeweils bei erneutem Auftreten von Krankheitssymptomen durchgeführt. Die Effizienz der Botulinumtoxin Typ A Injektionen in den Detrusor wurde anhand von Reflexvolumen, maximalem Detrusordruck und Compliance aufgrund der urodynamischen Daten bewertet. Die Botulinumtoxin Typ A Injektionen in den Detrusor wurden bezugnehmend auf die Technik von Schurch durchgeführt (Schurch et al., 2000). Es wurde auf zystoskopischem Weg eine Gesamtmenge von 300 IU BOTOX® (Allergan, USA) bei 20 Patienten oder 750 IU Dysport® (Ipsen, UK) bei vier Patienten an 20 bis 30 Stellen in den Detrusor injiziert. Dabei wurde das Trigonum vesicae ausgespart. Bei 21 Patienten wurde dies erstmals, bei zwei zum zweiten mal und bei einem Patienten zum dritten mal durchgeführt. Alle Untersuchungen und Eingriffe wurden von einem erfahrenen Untersucher durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (2002) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

Die Studie wurde durch die Züricher Ethikkommission genehmigt und eine rechtswirksame schriftliche Einverständniserklärung aller beteiligten Patienten lag vor.

3.1.1.2. Gewebeentnahme und Aufarbeitung der Proben

Nach den urodynamischen Untersuchungen wurden die Proben entweder endoskopisch, oder durch einen bereits geplanten offenen Eingriff gewonnen. Es wurden 26 Proben endoskopisch und vier durch einen offenen Eingriff erlangt. 13 Proben, die unmittelbar vor der Injektion von Botulinumtoxin Typ A entnommen wurden, wurden der Gruppe I zugeteilt. 17 Proben nach Injektion der Gruppe II. Proben von sechs Patienten gehörten zu beiden Gruppen, da sowohl vor, als auch sechs Wochen bis vier Monate nach der Injektion eine Probe gewonnen wurde. Von den 17 Proben der Gruppe II wurden sechs Proben während guter Wirksamkeit des Botulinumtoxins Typ A gewonnen und elf nachdem der Effekt nachgelassen hatte und eine Detrusorüberaktivität wieder auftrat. Die endoskopisch gewonnenen Proben stammen alle aus der posterolateralen Blasenwand, 1,5-2 cm oberhalb einer Uretheröffnung. Die während der offenen Eingriffe gewonnenen Proben wurden mit einem Skalpell aus der seitlichen Blasenwand entnommen, um die Zellzerstörung zu minimieren und Artefakte durch den Elektrokauter zu vermeiden. Jede Probe wurde sofort nach Entnahme in eine gekühlte Fixationslösung, bestehend aus 3 % Glutaraldehyd in 0.1 molarem Cacodylatpuffer, gegeben und schnellstmöglich in das Pathologische Institut der Universität Bonn gesendet. Hier erfolgte eine standardisierte Aufarbeitung für die elektronenmikroskopische Betrachtung (Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 1993a; Hailemariam et al., 1997).

3.1.2. verwendete Materialien

- 3 % Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
- Dimethylarsäure–Na–Salz ph=7,4	Merck, Darmstadt
- Handelsübliche Rasierklinge (Supersilver)	Gillette, Berlin
- 2 % OsO ₄ (Osmiumtetroxid, Polysciences, USA)	Plano, Wetzlar
- Ethanol	Merck, Darmstadt
- Epon 812 TM (21045)	Serva, Heidelberg
- Leergelatinekapseln Grösse 0	Pharmapol, Dägeling
- Uranylacetat	Merck, Darmstadt
- PWS (Wolframatophosphorsäure)	Merck, Darmstadt
- Propylenoxid(807027)	Merck, Darmstadt
- Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
- Deckglas	Menzel-Gläser, Braunschweig
- Di–Natriumtetraborat (6310)	Merck, Darmstadt
- NaOH–Plätzchen	Merck, Darmstadt
- Kaliumnatriumtartrat p.a. (8087)	Merck, Darmstadt
- Azur II (9211)	Merck, Darmstadt
- Methylenblau	Merck, Darmstadt
- Eukitt	Plano, Wetzlar
- Aqua-Bidest	Selbsterstellung, Bonn
- Bleiacetat suprapur (7374)	Merck, Darmstadt
- Xylol	Merck, Darmstadt
- Präparatträgernetzchen 200 mesh Kupfer G200 Hs–C3	Plano, Wetzlar
- Negative (Scientia)	Ahlemeyer, Duisburg
- Entwicklerlösung für Negative	Ahlemeyer, Duisburg
- Fixierlösung für Negative	Ahlemeyer, Duisburg
- Bovira–Speed (BH 310 RC Grade 4)	Agfa, Leverkusen
- Entwicklerlösung für Fotos (Dokumol)	Tetenal, Norderstedt
- Fixierlösung für Fotos (LP-Fix Supra)	Maco, Hamburg
- Stoppbad für Fotos	Tetenal, Norderstedt
- Agepon	Agfa-Gevaert, Leverkusen
- DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid)(20755)	Serva, Heidelberg

- MNA (Methylnadic Anhydrid)(29452) Serva, Heidelberg
- DMP (2, 4, 6-Tri-(dimethylaminomethyl)-phenol)(36975) Serva, Heidelberg
- Filter (Nr. 595 1/2) Schleicher und Schüll, Dassel
- Parafilm M American Nat. Can, Chicago

3.1.3. verwendete Geräte

- Ultratrim Reichert-Jung (Leica), Wien
- Brutschrank Heraeus, Hanau
- Ultramikrotom UM 4 LKB, Bromma, Schweden
- Diamantmesser (Diatom) Diatom, Schweiz
- Lichtmikroskop Laborlux D Leitz, Wetzlar
- Elektronenmikroskop CM 10 Philips, Kassel
- Belichter Leitz, Wetzlar
- Trockenwalze Meteor, Siegen
- Lupenzentimetermass Leitz, Wetzlar
- GraphPad Prism™version 3.02 GraphPad Inc., San Diego
- Glantz`s Primer of Biostatistics version 4.02 McGraw-Hill Inc., New York
- Gridbox Leica, Wien
- Magnetrührer Ikamag RET IKA, Staufen
- Heissluftschrank Meteor, Siegen
- Kugelpipette aus Pasteurpipetten Selbstherstellung, Bonn
- Streckofen Medax, Kiel
- Küvette Glaswerk-Wertheim, Wertheim
- Petrischale Glaswerk-Wertheim, Wertheim

3.2. Methodik

3.2.1. Einführung

Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung von biologischem Material sind einige grundsätzliche präparative Probleme zu beachten. Das Präparat ist im Inneren eines Elektronenmikroskopes einem Hochvakuum ausgesetzt und muss zusätzlich einer hohen Energiebelastung standhalten. Die Durchdringtiefe des Elektronenstrahls ist dabei auf einige Nanometer begrenzt. Da das biologische Material aber zu einem großen Anteil aus Wasser besteht und meistens mehrere Mikrometer bis Millimeter dick ist, muss man dieses Material in eine Umgebung bringen, die im Vakuum nicht flüchtig ist. Ferner ist es nötig, da Details im Innern der Struktur untersucht werden sollen, dass man das Präparat in geeignete Scheiben schneidet. Man ersetzt Wasser durch flüssigen Kunststoff, härtet (polymerisiert) diesen aus und schneidet die Präparate auf Mikrotomen in Scheiben, die im TEM durchstrahlbar sind.

3.2.2. Einbettung und Färbung der Biopsien

Die Proben wurden zunächst mit einer Rasierklinge vorsichtig und ohne Quetschung kleiner geschnitten (ziehender Schnitt) und in frisches Fixans gebracht. Dann folgte die Fixierung, Entwässerung und Einbettung in Epoxidharz sowie die anschließende Färbung.

Durch Quervernetzung werden zelluläre Strukturen stabilisiert und eine Dislokation oder Aggregation von Makromolekülen während der Präparation weitgehend vermieden. Es erfolgte eine Doppelfixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid (OsO_4) (Millonig, 1961). Die erste Fixierung mit Glutaraldehyd vernetzt dabei hauptsächlich die Proteine und die Nachfixierung mit OsO_4 eher die Lipide.

1. Immersionsfixierung:

- 3 % Glutaraldehyd in 0,1 molarem Cacodylat-Puffer
(Dimethylarsäure–Na–Salz) $\text{pH}=7,4$ 3 h bis 3 d
- spülen in 0,1 molarem Cacodylat–Puffer 2 x 15 min.
- vorsichtiges Zerkleinern der Proben in 1-10 Würfel, um
ca. 1mm^3 große Blöcke zu erhalten (handelsübliche Rasierklinge)

2. Nachfixierung:

- 2 % OsO₄ in 0,1 molarem Cacodylat-Puffer bei 4° C 2,5 h
- spülen in 0,1 molarem Cacodylat-Puffer 2 x 15 min.

Zellen enthalten ca. 80% Wasser. Da Kunstharze mit Wasser nicht mischbar sind, muss der zelluläre Wasseranteil durch organische Lösungsmittel ersetzt werden. Hierfür wurde Ethanol verwendet. Die Lösungsmittel müssen mit Wasser und mit den Einbettungsharzen mischbar sein. Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer stufenweise konzentrierter werdenden Lösungsmittelreihe. Die jeweilige Verweildauer einer bestimmten Konzentration richtete sich nach der Größe der Proben, die 1 mm³ nicht überschreiten sollte.

Es erfolgte ferner eine Objektnachkontrastierung in der 70%igen Alkoholstufe während der Dehydration der Probe. Vorgenommen wurde sie mit 0,5%igem Uranylacetat (0,25g Uranylacetat ad 50ml 70%igem Ethanol) und 1%iger PWS (Wolframatophosphorsäure) (0,5g PWS ad 50 ml 70%igem Etanol). Da Uranylacetat in Wasser schwer löslich ist, muss sehr lange gerührt werden. PWS dagegen ist sofort in Ethanol löslich. Aus diesem Grund wird das Uranylacetat zuerst im Ethanol gelöst und nach dessen Lösung PWS hinzugegeben (personal communication J.Bedorf).

3. Dehydratation und Objektnachkontrastierung

- Dehydratation in 30 %igem Ethanol 5 min.
- Dehydratation in 50 %igem Ethanol 10 min.
- Dehydratation in 70 %igem Ethanol + 0,5 % Uranylacetat
und PWS bei 4° C 60 bis 90 min.
- Dehydratation in 70 %igem Ethanol 5 min.
- Dehydratation in 90 %igem Ethanol 2 x 10 min.
- Dehydratation in 96 %igem Ethanol 2 x 10min.
- Dehydratation in absolutem Ethanol 10 min.
- Dehydratation in absolutem Ethanol 2 x 15 min.
- Propylenoxid 3 x 10 min.

Überführen in Epoxidharz:

Aus Viskositätsgründen beginnt man bei der Kunstharzinfiltation mit Mischungen aus Lösungsmittel und Einbettungsmittel. Bei Verwendung von Ethanol und Epoxidharz sollte Propylenoxid als Zwischenmedium verwendet werden. Vollständig infiltrierte Proben wurden in kunstharzgefüllte Gelatinekapseln überführt und im Brutschrank über 24 Stunden bei 70° C ausgehärtet (Luft, 1961).

Aus 62 ml Epon 812™ und 100 ml DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid) wird zunächst durch vorsichtiges Vermischen mit Hilfe eines Magnetrührers die Stammlösung Epon A, sowie aus 100ml Epon 812™ und 89ml MNA (Methylnadic Anhydrid) die Stammlösung Epon B hergestellt. Jeweils 10 ml der beiden Stammlösungen Epon™ A und B, sowie 0,3 ml DMP (2, 4, 6-Tri-(dimethylaminomethyl)-phenol) ergeben nach erneuter Durchmischung mittels Magnetrührer ohne Schlierenbildung das Einbettungsgemisch Epon™ C. Dieses ist nicht haltbar und muss daher unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden. 20ml des Epon™ C Gemisches reichen für die Einbettung von zwei Proben aus (personal communication J.Bedorf).

- | | |
|---|------------|
| - Propylenoxid und Epon™ C im Verhältnis 1:1 mischen | über Nacht |
| - Präparat in Epon™ C einsinken lassen | 1 h |
| - Gelatinekapseln mit Epon™ C füllen | |
| - Gewebestücke in die gefüllten Kapseln übertragen und einsinken lassen | 1 h |
| - Polymerisation im Brutschrank bei 70° C | 24 h |

Die so erhaltenen Probenkapseln wurden mit dem Gerät Ultratrim der Firma Reichert-Jung getrimmt und auf das Schneiden vorbereitet. Die Kunststoffblöcke wurden dabei zu Pyramiden mit trapezförmiger Grundfläche getrimmt. Die Anschnittfläche (ebenfalls trapezförmig) betrug ca. 0.3-0.8 mm². Saubere, parallele Kanten und feine Oberflächen waren Grundvoraussetzung für ein gleichmäßiges Ablösen der Ultradünnschnitte während des späteren Schneidevorgangs mittels Ultramikrotom. Das zugrundeliegende Prinzip für derart kleine, definierte Vorschubraten beruht auf thermisch kontrollierter Ausdehnung (Abb.2) des Präparatearmes.

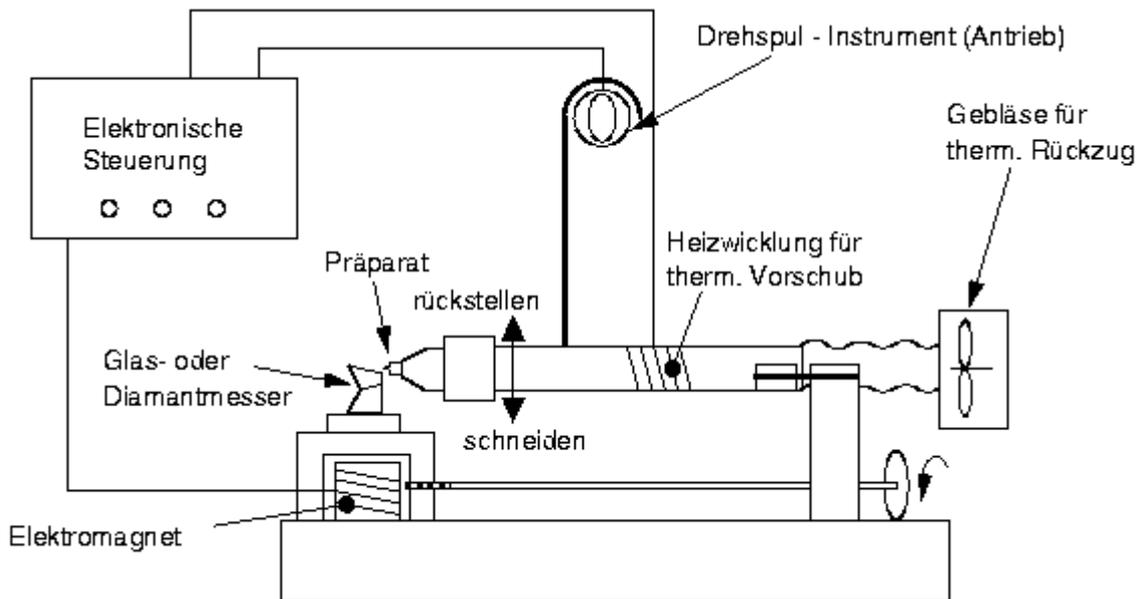


Abbildung 2: Ultramikrotom mit thermischem Vorschub

Von jeder Kapsel wurde mit dem Gerät Ultramikrotom UM 4 mit einem Diamantmesser ein Semidünnschnitt von ca. $0,5\mu\text{m}$ - $1\mu\text{m}$ Dicke angefertigt.

Diese wurden nach der Richardson–Methode gefärbt (Richardson et al., 1960):

- Die Semidünnschnitte mit einer Kugelpipette auf einen mit einem Wassertropfen (Aqua-Bidest) beschickten Glasobjektträger übertragen
- Vermerken der Präparat- und Kapselnummer am Rand mit Bleistift
- Schnitt einen halben Tag auf dem Objektträger trocknen lassen
- Färbelösung A [1 g di-Natriumtetraborat (Merck 6310) und 1 g Methyleneblau (Merck) ad 100ml Aqua-Bidest] und Lösung B [1 g Azur II (Merck 9211) ad 100ml Aqua-Bidest] zu gleichen Teilen mischen.
- Einen Tropfen Färbelösung auf den Schnitt geben und 3-4 min. warten
- Überschüssige Färbelösung mit Aqua-Bidest abspritzen, Schnitt nicht trocknen lassen
- Objektträger in eine Küvette mit 90%igem Ethanol differenzieren (Farbtoneinstellung)
- Mit 100 %igem Ethanol den Schnitt dehydrieren, abwischen und auf dem Streckofen bei 60°C antrocknen lassen
- Objektträger in eine Küvette mit Xylol stellen

- Auf den noch feuchten Objektträger einen kleinen Tropfen Eukit als Einschlussmittel geben und ein Deckglas auflegen
- Präparat trocknen lassen

Die Semidünnschnitte wurden lichtmikroskopisch betrachtet und die Blöcke mit dem größten Gehalt an Muskelgewebe selektiert, sowie diejenigen ohne Muskelgewebe aussortiert. Von den Blöcken mit Muskulatur wurden mit dem Gerät Ultramikrotom UM 4 mit einem Diamantmesser je zwei Ultradünnschnitte pro Block mit einer Dicke von ca. 40nm–50nm angefertigt (Interferenzfarbe Silber). Diese wurden auf kupfernen Präparatträgersnetzchen (Grids) mit einem Durchmesser von 3mm aufgefangen.

Dünnschnitte von biologischen Präparaten haben im TEM ein geringes Elektronenstreuvermögen. Um die biologische Struktur sichtbar zu machen, muss ihr Kontrast durch Anlagerung von Schwermetallatomen auf der Schnittoberfläche erhöht werden. Gebräuchliche Kontrastierungsmittel sind Lösungen von Uranylacetat (0,5% bis 6%) sowie verschiedene Bleisalzlösungen (-acetat, -citrat, -hydroxid etc.). Solche Kontrastierungen werden häufig auch kombiniert verwendet. Dieses Verfahren bezeichnet man als Schnittnachkontrastierung (personal communication J. Bedorf). Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung des Kontrastes bietet die oben beschriebene und von uns angewandte Objektnachkontrastierungsmethode im Vorhinein.

Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleiacetat (Millonig, 1961):

- 3,5 % Uranylacetat (1,45 g NaOH-Plättchen und 0,25 g Kaliumnatriumtartrat p.a.) ad 100ml Aqua-Bidest mischen
- In eine mit Parafilm ausgelegten Petrischale 4 Tropfen der Lösung geben und die Grids vorsichtig auf die Tropfen auflegen und inkubieren 15-20 min.
- Danach die Grids mit Aqua-Bidest gut abspülen (Spritflasche)
- Bleiacetatgemisch [(6,3 g Bleiacetat suprapur) ad 100ml Aqua-Bidest] mit Magnetührer herstellen und filtern
- Grids erneut mit dieser Lösung inkubieren 7 min.
- Danach die Grids mit Aqua-Bidest gut abspülen (Spritflasche)
- Trocknung bei Raumtemperatur 24 h
- Archivieren und Einsortieren in eine spezielle Gridbox

3.2.3. Photographie und Entwicklung

Danach erfolgte die elektronenmikroskopische Betrachtung und Photographie in verschiedenen Vergrößerungen (x3,300–x104,500) der aufgearbeiteten Ultradünnschnitte mit dem Philips CM 10 Elektronenmikroskop bei einer Hochspannung von 60 kv. Die hierzu verwendeten Negative wurden nach folgender Standardprozedur entwickelt und anschließend archiviert:

- | | | |
|---|------------------------------|----------------|
| - | Entwicklerlösung | 5 min. |
| - | Fixierlösung | 5 min. |
| - | Wässern in fließendem Wasser | 10 bis 15 min. |
| - | Trocknen im Heissluftschrank | 3 Stunden |

Im weiteren Verlauf wurden unter Benutzung eines Belichters von jedem Negativ zwei Abzüge auf Bovira–Speed Fotopapier mit dem Vergrößerungsfaktor 1,7 angefertigt und nach Standardprozedur entwickelt:

- | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|
| - | Entwicklerlösung | 5 bis 40 sek. |
| - | Stoppbad | 5 bis 10 min. |
| - | Bewegte Fixierlösung | 10 min. |
| - | Wässern in fließendem Leitungswasser | 15 bis 20 min. |

Die Positive wurden zum Durchbrechen der Oberflächenspannung des Wassers in einem Agepon-Wasser-Gemisch kurz gewendet, dann mittels Trockenwalze getrocknet, archiviert und anhand nachstehend beschriebener Kriterien ausgewertet.

3.2.4. Ultrastrukturelle Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch genaues Untersuchen der Ultrastruktur von Muskel (M), Interstitium (I) und Nerven (N) nach der MIN Prozedur für die strukturelle Auswertung des Detrusors sowohl qualitativ als auch quantitativ (Elbadawi, 1991). Diese wurde großzügig anhand von elektronenmikroskopischen Photographien (45 oder mehr Photos pro Biopsie) in verschiedenen Vergrößerungen (x7,425–x48,600) dokumentiert. Die Proben wurden in zufälliger Reihenfolge mikroskopiert, ohne die Gruppenzugehörigkeit oder die dazugehörigen klinischen und urodynamischen Untersuchungsergebnisse zu kennen. Die Beobachtungen wurden

ausgewertet, mit den klinischen und urodynamischen Daten korreliert und beide Gruppen miteinander verglichen. Die Auswertung folgte nach exakt aufgestellten Kriterien und einem standardisiertem Protokoll (Elbadawi, 1991; Elbadawi et al., 2003). Dies wird im nachfolgenden näher erläutert.

3.2.4.1. Muskelzellen und Interstitium

Die Detrusormuskulatur wurde im Hinblick auf die Faszikelstruktur und den Abstand der einzelnen Muskelzellen in Form von „compact“, „intermediate“ und „loose“ (Abb. 3-8), sowie auf die oben beschriebenen verschiedenen ultrastrukturellen Muster (full degeneration, myohypertrophy, complete dysjunction und dense band) nicht-neuropathischer Blasendfunktionsstörungen in Zusammenhang mit verminderter Detrusorkontraktilität (IDC), Detrusorüberaktivität (DO) und Blasenauslassobstruktion (BOO) hin untersucht (Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 1997; Hailemariam et al., 1997). Dazu wurden von jeder Biopsie mindestens zehn Übersichtsaufnahmen der Detrusormuskulatur in einer niedrigen Vergrößerung (x7,425) angefertigt und mindestens 100 Muskelzellen pro Biopsie auf ihre interzellulären Abstände hin untersucht und vermessen. Ein Muskelfaszikel wurde als die kleinste erkennbare kompakte Einheit von zusammen angeordneten Muskelzellen (üblicherweise 4-16 Zellen) definiert (Elbadawi et al., 1993a; Hailemariam et al., 1997). Die Faszikelstruktur („loose, intermediate, compact“) wurde anhand folgender drei charakteristischer ultrastruktureller Eigenschaften ermittelt.

Erstens, der Grad der Distanzierung einzelner Muskelzellen voneinander (regelmäßige, nahe Abstände beim compact, leicht verbreiterte, teilweise unregelmäßige beim intermediate und sehr unregelmäßige, stark differierende Abstände beim loose Faszikel).

Zweitens, das Auftreten der im normalen Detrusor vorkommenden intermediate cell junctions (häufig, leicht zu finden im compact, sporadisch auftretend im intermediate und selten, sehr schwer zu finden im loose Faszikel).

Drittens, der Gehalt der Interzellularspalten an kollagenen und elastischen Fasern (geringgradig im compact, erhöht im intermediate und sehr reichhaltig im loose Faszikel) (Hailemariam et al., 1997).

Benachbarte Zellen wurden auf das Vorliegen von intermediate cell junctions (IJ), die im normalen Detrusor vorkommen (Abb. 10-13) und auch auf die neu entdeckten sehr engen Appositionen (very close appositions CA) hin untersucht (Abb. 14-20). Diese engen

Appositionen beinhalten die sogenannten „protrusion junctions“ und die „ultra close abutments“ sowie die erst kürzlich identifizierten morphologischen Varianten der „ultra close abutments“ (Elbadawi, 1993; Hailemariam et al., 1997; John et al., 2001). Bei den „protrusion junctions“, den „ultraclose abutments“ und deren Varianten treten sehr nahe Zellabstände von 6–12 nm auf. Diese „protrusion junctions“ und „ultra close abutments“ sowie ihre morphologischen Varianten werden in dieser Studie mit dem Sammelbegriff „intimate cell appositions“ (ICA) bezeichnet (Elbadawi et al., 2003).

Die Einordnung als schwere Degeneration der Muskelzellen wurde anhand von ungeordneten sarkoplasmatischen Myofilamenten und dense bodies, der Bildung von Vakuolen, Sequestern, oder Blasen im Sarkoplasma sowie anhand von Zellschrumpfung oder Zellfragmentierung erfasst (Abb. 6-8) (Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 1997; Hailemariam et al., 1997). Die Muskelzelldegeneration wurde als selten eingestuft, wenn ein Viertel oder weniger der untersuchten mikroskopischen Gesichtsfelder Zerstörung aufwiesen, als fokal bei Beeinträchtigung eines Viertels bis der Hälfte der untersuchten mikroskopischen Gesichtsfelder und als weit verbreitet bei einer Beeinträchtigung der Hälfte bis aller Felder. Eine Degeneration sämtlicher Muskelzellen wurde als generalisierte Degeneration bewertet. Diese ging in der Regel mit einer Verdichtung, einer verstärkten Elektronendichte oder der Zerstörung des betroffenen Sarkoplasmas einher (Abb. 8) (Elbadawi et al., 2003). Die Muskelzellen wurden darüber hinaus auch auf Anzeichen regenerativer Vorgänge wie Nukleoli, erweitertes endoplasmatisches Retikulum und gehäuft auftretende Mitochondrien untersucht.

Für die quantitative Auswertung wurde die Anzahl der Biopsien mit veränderter Anordnung der Zellstruktur oder mit Änderungen der ultrastrukturellen Morphologie gezählt und im Hinblick auf klinische und urodynamische Daten ausgewertet. Dabei wurde besonders auf Zuordnung zur klinischen Biopsiegruppe, Dauer der Blasenfunktionsstörung, Art der Biopsieentnahme und begleitende Funktionsstörungen (verminderte Detrusorkontraktilität IDC; Blasenauslassobstruktion BOO und Detrusor-Sphincter-Dyssynergie DSD) geachtet. Die Muskelzellprofile und Ihre Verbindungen wurden gezählt und das Verhältnis von intermediate cell junctions (IJ) und intimate cell appositions (ICA) zu Muskelzellen (MC) und zueinander bestimmt (IJ:MC; ICA:MC; IJ:ICA). Die Abstände wurden an den Stellen der größten Annäherung im Bereich der Zellverbindungen zwischen den Zellmembranen gemessen. Zellen, die mittels intimate cell appositions (ICA) zu Ketten von fünf oder mehr verbunden waren,

wurden als complete disjunction pattern (CDP) bezeichnet (Abb.9). Ketten von weniger als fünf verbundenen Zellen als incomplete disjunction pattern (IDJP) (Hailemariam et al., 1997). Dieses Muster wurde insbesondere im Hinblick auf Detrusorhyperaktivität untersucht.

Desweiteren wurde das Interstitium auf eine Vermehrung der kollagenen und elastinen Fasern sowie Zelldetritus untersucht.

3.2.4.2. Nervenzellen

Die ultrastrukturelle Morphologie und die Anzahl der Axonendkolben (Axonterminals) an den neuromuskulären Endplatten (Kontaktstellen von Axon und Muskelzelle) sowie die der Schwann'schen Zellen mit ihren umhüllten nicht myelinisierten und myelinisierten Axonen (Axonpreterminal, intervariköses Segment) wurden ausgewertet. Dabei wurden die Profile der Axonendkolben (Terminals), die nicht myelinisiert sind, und die sogenannten Preterminals, die zumindest teilweise von Schwann'schen Zellen umhüllt sind, als normal, degeneriert oder regenerativ eingestuft (Elbadawi et al., 2003).

Normale Axonterminalen des Detrusors sind nicht myelinisiert und nicht umhüllt (ohne Schwann'sche Scheide). Sie enthalten zahlreiche kleine Vesikel (small vesicles, SV) von ≈ 60 nm Durchmesser und ein bis drei längliche Mitochondrien mit gut sichtbaren Cristae (Abb. 21-25). Der Abstand der Axonterminals an der neuromuskulären Endplatte zur Muskelzelle ist sehr gering. Der Interzellulärspalt beträgt im Allgemeinen 15-25 nm bei nahen („close“), 25-40 nm bei beinahe nahen („almost close“) oder 40-80 nm bei „en passant“ Endplatten (Elbadawi, 1983). Die Abstände im Bereich der neuromuskulären Endplatte wurden dabei als kürzeste Verbindung zwischen Axonendkolben und zugehöriger Muskelzellmembran gemessen. Cholinerge Axone enthalten elektronenmikroskopisch klare, durchsichtige kleine Vesikel (Abb. 21, 22), während in adrenergen Axonen dichte, kleine granuläre Vesikel enthalten sind (Abb.23, 24).

Diese adrenergen Vesikel sind im in-vitro fixiertem Präparat nur sehr selten zu sehen, da es zu einer sehr raschen Entleerung des Neurotransmitters Noradrenalin, der für die charakteristische Färbung der Vesikel verantwortlich ist, kommt. Daher wird die Anzahl an adrenergen Axonen in menschlichen Biopsien im allgemeinen unterschätzt. Ein Korrekturverfahren, das zur besseren Darstellung und Intensivierung der dichten Granula führen würde, die Injektion von 5-Hydroxydopamin in vivo vor Biopsieentnahme, kann beim Menschen nicht angewandt werden (Atta et al., 1984; Elbadawi et al., 1984; Elbadawi und Atta, 1984). Die Profile von Axonendkolben enthalten relativ häufig ein bis zwei große elektronendichte Vesikel („large

dense cored vesicles“, LDCV) von ≈ 120 nm Durchmesser. Man nimmt an, dass sie purinerge und/oder peptiderge Cotransmitter enthalten, die zusätzlich zu dem in den kleinen Vesikeln gespeicherten Acetylcholin bei cholinergen oder Nordrenalin bei adrenergen Nervenendigungen, vorkommen (Atta et al., 1984; Daniel et al., 1983).

Die Axonpreterminals ähneln in Ihrer Morphologie den Axonendkolben, sind aber von Anteilen von Schwann'schen Zellen umhüllt und haben keinen direkten Kontakt zur Muskelzelle (Abb. 26,31).

Intervariköse Segmente sind Abschnitte von nicht myelinisierten und myelinisierten Axonen innerhalb von Nervenbündeln, die auch von Schwann'schen Zellen umhüllt sind. Sie entsprechen mehr zentral gelegenen Axonabschnitten und enthalten in ihrem Axonplasma eine Vielzahl an Neurotubuli und Neurofilamenten, aber nur sehr wenige kleine Vesikel (SV) und gar keine großen elektronendichten Vesikel (LDCV) (Abb. 27).

Die Profile von degenerierten Axonendkolben weisen nur sehr wenige bis gar keine kleinen Vesikel und oftmals eine Abstandsvergrößerung zur Muskelzelle von >80 bis sogar über 200 nm auf. Eine Abstandsvergrößerung als einziges Merkmal wurde jedoch nicht als Zeichen von axonaler Degeneration gewertet (Abb. 28, 29, 31).

Ein weiteres Anzeichen für axonale Degeneration besteht in aufgetriebenen Mitochondrien mit verformten Cristae, sofern diese nicht durch Artefakte infolge Zellmanipulationen bei Blasenoperationen entstehen, die ein ähnliches Bild bieten (Mugnaini und Friederich, 1981). Auch die Mitochondrien der glatten Muskelzelle können durch Gewebemanipulation bei operativen Eingriffen ähnliche Veränderungen erfahren.

Die Degeneration myelinisierter Axone innerhalb von Nervenbündeln wurde anhand von Veränderungen festgemacht, die denen der Waller'schen-Degeneration ähneln sowie dem Untergang von intervarkösen Axonsegmenten und Myelinscheidenunregelmäßigkeiten bis hin zu Aufsplitterungen Zereissungen und Spaltungen der Myelinscheide (Friede und Martinez, 1970) (Abb. 34).

Das kardinale Anzeichen für Wachstum und Regeneration ist die Vermehrung von axonplasmatischen Organellen. Sogenannte „sprossende Axone“ sind ultrastrukturell durch viele große elektronendichte Vesikel (LDCV), reichlich Mitochondrien und einen höheren Gehalt an Neurotubuli und Neurofilamenten im Axonplasma gekennzeichnet (Bluemcke und Niedorf, 1965; Lampert, 1967). Alle Axonprofile der Biopsien einschließlich solcher innerhalb von

Nervenbündeln wurden auf diese Strukturen hin untersucht und verglichen. Da keine einheitlichen Standards bestehen, wurde das Vorkommen von vier oder mehr Mitochondrien sowie drei oder mehr großen elektronendichten Vesikeln (LDCV) pro Axonprofil als vermehrt gewertet (Elbadawi et al., 2003). Axonprofile, die beide Merkmale enthielten, wurden als aktive Axonaussprossungen („sprouts“) definiert (Abb. 36, 37). Solche Axonprofile, die mit reichlich vorhandenen LDCV's aber nur drei oder weniger Mitochondrien ausgestattet waren, wurden lediglich als kopeptiderge Axone definiert (Abb. 35, 38). Die aktiven Axonaussprossungen sind Zeichen einer aktuell stattfindenden aktiven Regeneration (Elbadawi et al., 2003). Als kopeptiderg bezeichnete Axonendkolben und Axonpreterminals wurden als normal eingestuft und repräsentieren eine stabile Regeneration, wenn sie eine Vielzahl an kleinen Vesikeln (SV) enthielten. Waren diese kleinen Vesikel (SV) vermindert oder gar nicht vorhanden, so wurden sie als degenerierend eingestuft und sind vermutlich als Zeichen einer frustranen „regressiven“ Regeneration zu werten (Elbadawi et al., 2003).

Das Vorkommen von übermäßig vielen Neurofilamenten und Neurotubuli wurde bei einzelnen schräg angeschnittenen Axonsegmenten ohne Vorkommen von kleinen Vesikeln nicht beachtet, da die schräg angeschnittenen Zellausläufer von aktivierten Schwannzellen ein ähnliches ultrastrukturelles Bild bieten und somit eine Unterscheidung nicht genau möglich ist (Payer, 1979).

Schwann'sche Zellen wurden auf Veränderungen hin untersucht, die denen im Rahmen peripherer Nervendurchtrennungen aufgetretenen ähneln und im Zusammenhang mit axonaler Degeneration und Regeneration vorkommen (Knoche und Terwort, 1973; Payer, 1979). Normalerweise enthalten Schwann'sche Zellen nur wenige Mitochondrien, ein unterentwickeltes endoplasmatisches Retikulum und einige Ribosomen (Bluemcke, 1963). Aktivierte Schwann'sche Zellen dagegen enthalten reichlich Mitochondrien, Ribosomen, Mikrofilamente und Mikrotubuli sowie ein dilatiertes endoplasmatisches Retikulum (Abb. 38, 39). Die Zellfortsätze ähneln denen von Axonprofilen und es sind extrazelluläre Anhäufungen von dichtem Kollagen vorhanden (Nathaniel und Pease, 1963; Payer, 1979).

Die Axonprofile wurden anhand obiger Merkmale quantitativ ausgewertet und in die jeweilige Kategorie eingeordnet. Der prozentuale Anteil jeder Kategorie an der Gesamtheit der Axone wurde ermittelt und innerhalb der beiden Patientengruppen verglichen. Das Vorkommen von Schwann'schen Zellen mit Merkmalen der Aktivierung wurde innerhalb der beiden

Patientengruppen verglichen, ebenso wurde das Verhältnis der verschiedenen Axonkategorien im Hinblick auf die Krankheitsdauer ausgewertet.

3.3. Fragestellung

Diese Studie dient der Erfassung von ultrastrukturellen Veränderungen der Blasenmuskulatur von Patienten mit neurogener Blasenfunktionsstörung und Detrusorüberaktivität nach Botulinumtoxin Typ A Injektion. Die beiden Gruppen wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht und die Ergebnisse sowohl quantitativ als auch qualitativ ausgewertet und verglichen.

3.4. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von Computersoftware (GraphPad Prism™version 3.02; Glantz's Primer of Biostatistics version 4.02) erstellt (Glantz und S.A., 1996). Die Häufigkeit von qualitativen Beobachtungen, bezogen auf die Anzahl der Biopsien oder der Muskelzellen, wurde mit dem χ^2 und Fisher's Exact Test berechnet. Die quantitativen Daten wurden auf eine Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnow Test überprüft und anschließend mit dem Student t-Test oder ANOVA, sowie dem Student-Newman-Keuls Test für Mehrfachvergleiche ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0.05$ betrug.

4. Ergebnisse

4.1. Urodynamik

Die Injektionen von Botulinumtoxin Typ A in den Detrusor erwiesen sich in 19 von 24 (79%) der Patienten über einem Zeitraum von mehr als drei Monaten nach der Anwendung als wirksam.

Die Blasenkapazität erhöhte sich von im Mittel 200 ml (40ml–510ml) vor dem Eingriff auf einen Mittelwert von 450 ml (96ml–710ml) danach ($p=0.003$). Der maximale Detrusordruck nahm im Mittel von 50 cmH₂O (43 cmH₂O–58 cmH₂O) auf 10 cmH₂O (5 cmH₂O–36 cmH₂O) postoperativ ab ($p=0.001$). Die Blasencompliance veränderte sich nicht signifikant vor und nach Injektion von Botulinumtoxin Typ A ($p=0.095$). Die mittlere Compliance vor dem Eingriff betrug 22.5 ml/cmH₂O (10 ml/cmH₂O–100 ml/cmH₂O), danach 40 ml/cmH₂O (10 ml/cmH₂O–103 ml/cmH₂O). Bei den Patienten, die gut auf die Therapie mit Botulinumtoxin Typ A ansprachen, hielt der Effekt im Mittel für zwölf Monate (neun Monate–20 Monate) an. Fünf Patienten zeigten keinerlei klinische oder urodynamische Effekte nach der Botulinumtoxin Typ A Injektion in den Detrusor. Von diesen fünf Patienten besaßen drei eine stark reduzierte Compliance (4 ml/cmH₂O–12 ml/cmH₂O) vor dem Eingriff.

	Vor Botox Inj.	Nach Botox Inj.	Mittelwert	p
Blasenkapazität ml	40–510	96–710	200 450	= 0.003
Max. p Detrusor cmH₂O	43–58	5-36	50 10	=0.001
Blasencompliance ml/cmH₂O	10–100	10-103	22.5 40	=0.095

Tabelle 2: Urodynamische Veränderungen vor und nach Botolinum-A Toxin Injektion

4.2. Ultrastruktur der glatten Blasenmuskulatur

Es wurde in allen Fällen außer bei vier Biopsien eine ausreichende Anzahl an optimal ausgerichteten glatten Muskelzellen aufgefunden. Damit standen nach Ausschluß der vier Biopsien ungenügender Qualität, elf für die Gruppe I (vor Botulinumtoxin Typ A Injektion) und 15 Biopsien für die Gruppe II (nach Botulinumtoxin Typ A Injektion) für die geplante ultrastrukturelle Auswertung der glatten Blasenmuskulatur zur Verfügung.

4.2.1. Struktur der Muskelfazikel

Es wurden mindestens 100 Muskelzellen pro Biopsie auf Ihre interzellulären Abstände, Faszikelstruktur und Muskelzellverbindungen hin untersucht. Gut erkennbare Gruppierungen von Muskelzellen konnten in allen Proben entdeckt und entsprechen eingeteilt werden (Elbadawi, 1993). Dabei wurden in drei Proben compact Faszikel (annähernd normaler mittlerer interzellulärer Abstand 157–280nm), in 16 intermediate Faszikel (leicht erweiterter mittlerer Interzellulärer Abstand 161–595nm) und in sieben Proben sowohl compact als auch intermediate Faszikel beobachtet. Statistisch wurde kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Faszikelstruktur zwischen den beiden Gruppen I und II festgestellt ($p=0,445$). Bei einer selektiven Auswertung der Patienten, bei denen vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion Proben entnommen wurden, zeigte sich keine Veränderung der Faszikelstruktur. Es konnten keine maßgeblichen Veränderungen des Interstitiums nachgewiesen werden, insbesondere aber kein Anstieg des Gehaltes an kollagenen Fibrillen, Fasern oder elastischen Fibrillen.

Muskelfaszikelstruktur	Anzahl der Proben
Kompakt	3
Mittelgradig	16
Kompakt und Mittelgradig	7

Tabelle 3: Struktur der Muskelfaszikel

4.2.2. Muskelzellverbindungen: ultrastrukturelles Dysjunction Muster

Das sogenannte complete dysjunction pattern (CDP) als Zeichen der Detrusorüberaktivität (DO), bei dem sich fünf oder mehr Muskelzellen kettenartig verbinden (Hailemariam et al., 1997), wurde in allen Proben nachgewiesen. Sogenannte intermediate cell junctions (IJ) fehlten in drei (11,5%) und waren in unterschiedlichem Maße reduziert in 22 (84,6%) der Proben. In einer Biopsie der Gruppe II waren sie aber erhalten und traten dort häufiger auf als die intimate cell appositions (ICA). Das Verhältnis von ICA zu IJ lag dort bei 0,5. Die ICA's wurden in Ihren verschiedenen Ausprägungen in jeder Biopsie beobachtet. Dies beinhaltete auch die initial beschriebenen protrusion junctions und ultraclose abutments (Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 2003; Hailemariam et al., 1997). Manche benachbarten Muskelzellen waren sogar durch IJ's und ICA's miteinander verbunden. Sämtliche Arten von ICA's traten auf, wobei die fingerartig auslaufende Form die häufigste war. Einige Zellannäherungen waren wie ein Synzidium

aufgebaut und ließen die Sarkoplasmen beider Zellen als untereinander verbunden erscheinen. Dennoch konnten man an den charakteristische Eigenschaften wie Zellmembranen, Caveolen oder zwei unterschiedlich aussehenden Sarkoplasmen erkennen, dass es sich bei diesen Annäherungen um zwei verschiedene Zellen handelt (Abb. 13, 14).

Das Verhältnis von ICA zu IJ war im Bezug auf die beiden Patientengruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,443$). Das Verhältnis war bis auf eine Biopsie, in der mehr IJ's vorkamen, zu den ICA's hin verschoben (Streuung 2-109). Das Verhältnis von ICA zu IJ lag unter drei in drei der Biopsien und über drei in 22 Biopsien.

Zellverbindungen/Verhältnisse	Anzahl der Proben
CDP	26
Fehlen von IJ	3
Reduzierte IJ	22
ICA	26
ICA:IJ < 3	3
ICA:IJ > 3	22
ICA:IJ < 1	1

Tabelle 4: Darstellung der Zellverbindungen und deren Verhältnisse

4.2.3. Muskelzelldegeneration

Ein bestimmtes Maß an Muskelzelldegeneration wurde in allen Biopsien beobachtet. Die Degeneration war weit verbreitet in zwei, fokal in 22 und selten in zwei Biopsien ausgeprägt (Elbadawi, 1993; Elbadawi et al., 1997; Elbadawi et al., 2003; Haferkamp et al., 2003b; Hailemariam et al., 1997). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied im Bezug auf die Muskelzelldegeneration zwischen den beiden Gruppen I und II ($p=0,139$). Ebenfalls wurde keine Veränderung des Ausmaßes der Muskelzelldegeneration bei Patienten mit Biopsieentnahme vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion in den beiden jeweiligen Proben festgestellt.

4.3. Ultrastruktur der Nerven

Wie bereits oben erwähnt, wurden vier Biopsien infolge Mangels an Blasenmuskulatur von der Untersuchung ausgeschlossen. Bei weiteren fünf Proben konnten keine Axonendkolben oder Preterminalis in der elektronenmikroskopischen Untersuchung gefunden werden, obwohl in diesen Proben intervariköse Segmente der Axone vorhanden waren. Diese fünf Proben wurden von der ultrastrukturellen Auswertung hinsichtlich der Nerven ausgeschlossen. Somit verblieben insgesamt neun Proben der Gruppe I (vor Botulinumtoxin Typ A Injektion) und zwölf Proben der Gruppe II (nach Botulinumtoxin Typ A Injektion) für die ultrastrukturelle Auswertung der nervalen Komponenten.

In den verbliebenen 21 Proben wurden insgesamt 309 (durchschnittlich 15 pro Probe) Axonprofile, also Axonendkolben oder Preterminalis, ausgewertet. Es wurden in allen 21 Proben sowohl Axonendkolben mit zugehöriger muskulärer Endplatte als auch Preterminalis beobachtet. Adrenerge Axone mit deutlich elektronendichten kleinen, granulären Vesikeln wurden in fünf Proben aufgefunden (zwei in Gruppe I und drei in Gruppe II). Bündel von nebeneinander verlaufenden Axonpreterminalis wurden in 15 und Perineurium-gebundene Nervenbündel in vier Proben beobachtet. In diesen Nervenbündeln waren die Nerven in einer von vier Proben nicht myelinisiert und nur von Perineurium umgeben und in den anderen drei Proben sowohl myelinisiert als auch unmyelinisiert und von Perineurium umgeben. Die überwiegende Anzahl der ausgewerteten Axone, 204 (66%) enthielt Anzeichen von degenerativen Veränderungen, während 41 Axone (13%) Zeichen der Regeneration zeigten. 105 (34%) zeigten eine normale ultrastrukturelle Morphologie. Axonale Degeneration und Regeneration bestand in 17 Proben (81%) gleichzeitig. Davon entfielen sieben Proben auf Gruppe I und zehn auf Gruppe II. In 16 dieser 17 Proben wurden ebenfalls normale Axonprofile gefunden (sechs in Gruppe I und zehn in Gruppe II). Axonale Regeneration wurde nicht oder nur unzureichend in vier Proben (eins in Gruppe I und drei in Gruppe II) beobachtet.

Vorkommen	Anzahl der Nerven	%
Degenerative Axone	204	66
Regenerative Axone	41	13
Normale Axone	105	34

Tabelle 5: Darstellung der nervalen Degeneration

4.3.1. Axonale Degeneration

Es wurden in allen 21 Proben degenerativ veränderte unmyelinisierte Axone einschließlich der entdeckten adrenergen Axone gefunden. Der Anteil der Axone mit entweder verminderten oder gar keinen kleinen Vesikeln betrug im Mittel 70% (38,5%-100%) in der Gruppe I und 66,8% (38,5%-100%) in der Gruppe II. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des prozentualen Anteiles der degenerativ veränderten Axone zwischen den beiden Gruppen ($p=0,840$).

Normale Axonprofile fanden sich in sieben von neun Proben der Gruppe I mit einem medianen Anteil von 12,5% (0%-46%) und in elf von zwölf Proben der Gruppe II mit einem medianen Anteil von 23,2% (0%-53,8%) ohne einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,329$).

Die meisten Abstände der muskulären Endplatten zu der jeweiligen Muskelzelle waren vergrößert, also größer als 80nm. Wiederum gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Gruppe I und II diesbezüglich ($p=0,410$). In der Gruppe I trat eine Verbreiterung des Abstandes im Mittel in 92% (62,5%-100%), in Gruppe II in 81% (39,25%-100%) auf.

Axone mit verformten und aufgetriebenen Mitochondrien kamen in 18 Proben (86%) vor. In allen drei Perineurium-gebundenen Nervenbündeln mit sowohl myelinisierten, als auch unmyelinisierten Anteilen wurde ein Axonkollaps und eine unregelmäßig ausgebildete Myelinscheide mit Aufsplitterungen gefunden.

Vorkommen	Mittelwert Gruppe I in %	Streuung in %	Mittelwert Gruppe II in %	Streuung in %	P
Verminderte/Keine SV	70	38,5-100	66,8	38,5-100	0,840
Verbreiteter Abstand zur Endplatte	92	62,5-100	81	39,25-100	0,410

Tabelle 6: Darstellung des Anteils der Axone mit verminderten Vesikeln und deren Abstand zur Endplatte

4.3.2. Axonale Regeneration

Axonaussprossungen und oder kopeptiderge Axone wurden in 17 der 21 Proben mit gut erkennbaren nervalen Komponenten gefunden (81%). Davon entfielen sieben Proben auf Gruppe I und zehn auf Gruppe II. Die Prävalenz der Regeneration war damit in beiden Gruppen recht ähnlich mit 78% in Gruppe I und 83% in Gruppe II vertreten. Von den 309 ausgewerteten Axonterminals und Preterminals wurden vier als Axonaussprossungen, eines in Gruppe I und drei in Gruppe II identifiziert (Abb. 36, -37). Obwohl die Muskelproben der Gruppe II sechs Wochen bis 22 Monate (Mittelwert 8,6 Monate) nach der Botulinumtoxin Typ A Injektion entnommen wurden, konnten dennoch nur in drei der Proben Axonaussprossungen gefunden werden. Es wurden keine Axonaussprossungen in den vier Proben gefunden, die innerhalb sechs Wochen bis vier Monate nach der Injektion von Botulinumtoxin Typ A und bei bestehender guter klinischer Wirksamkeit entnommen wurden. Die drei Axonaussprossungen der Gruppe II wurden innerhalb der acht Proben gefunden, welche von Patienten entnommen wurden, die über die nachlassende Wirkung der Botulinumtoxin Typ A Injektion klagten und klinisch wieder symptomatisch wurden.

Der Anteil der kopeptidergen Axone und Preterminals betrug im Mittel 17% in Gruppe I (0%-46%) und 9,8% (0%-40%) in Gruppe II. Wiederum bestand kein statistisch signifikanter Unterschied im Auftreten von Axonaussprossungen ($p=0,787$) oder kopeptidergen Axonen ($p=0,724$) zwischen den beiden Gruppen.

Der Anteil der axonalen Regeneration war in allen der untersuchten Proben sehr gering. In beiden Gruppen war die axonale Regeneration auf einige wenige Axone beschränkt und in den meisten Fällen fand man in diesen dann ebenfalls Zeichen der Degeneration. 43% der gefundenen kopeptidergen Axone hatten verminderte kleine Vesikel (SV), ähnlich wie bei degenerierten Axonen, und dies obwohl in diesen Axonen auch eine vermehrte Anzahl von großen elektronendichten Vesikeln (LDCV) vorkam, wahrscheinlich als Zeichen einer rückläufigen Regeneration (Elbadawi et al., 2003). Die übrigen 57% der kopeptidergen Axone hatten reichlich große elektronendichte Vesikel (LDCV) und waren angefüllt mit kleinen Vesikeln (SV), wie sie bei normalen Axonen vorkommen, eher vereinbar mit einer stabilen Phase der Regeneration (Elbadawi et al., 2003; Haferkamp et al., 2003b). Diese beiden Formen der kopeptidergen Axone verhielten sich im Verhältnis innerhalb der beiden Gruppen nicht wesentlich unterschiedlich.

Vorkommen	Mittelwert Gruppe I in %	Streuung in %	Mittelwert Gruppe II in %	Streuung in %	p
Anteil der koeptidergen Axone/Preterminals	17	0-46	9,8	0-40	0,724

Tabelle 7: Darstellung der koeptidergen Axone

Vorkommen	Gruppe I	Gruppe II	Gesamt	p
Axonaussprossungen	1	3	4	0,787

Tabelle 8: Darstellung der Axonaussprossungen

4.3.3. Aktivierte Schwann`sche Zellen

Aktivierte Schwann`sche Zellen (Payer, 1979) wurden in allen der 21 Proben mit erkennbaren neuronalen Elementen sowohl innerhalb der Nervenbündel als auch bei den umhüllten Preterminals gefunden. Das Vorkommen von diesen aktivierten Schwannschen Zellen konnte nicht in Bezug zu einer der beiden Gruppen gestellt werden. Eine reichhaltige Anzahl an Mitochondrien innerhalb der Schwann`schen Zellen wurde in fünf (24%) der Proben festgestellt. In allen Proben wiesen die Schwann`schen Zellen eine Erhöhung bei der Zahl der Mikrofilamente und Mikrotubuli auf. Der Anteil des interzellulären Kollagens innerhalb des Perineuriums der vier gefundenen Nervenbündel war erhöht.

5. Diskussion

5.1. Beurteilung der urodynamischen Ergebnisse

Die urodynamischen Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante Zunahme des Reflexievolumens ($p=0,003$) und eine signifikante Abnahme des maximalen Detrusordruckes ($p=0,001$), nach Behandlung der vorliegenden neurogenen Detrusorüberaktivität mit Botulinumtoxin Typ A Injektion. Diese Verbesserungen konnten bei 79% der Patienten nachgewiesen werden und dauerten im Mittel für zwölf Monate an.

Damit decken sich diese Ergebnisse mit den Erfahrungen von Schurch et al. und Stöhrer et al, die erstmals die Botulinumtoxin Typ A Injektion zur Behandlung der Detrusorhyperaktivität als Alternative zur anticholinergen Medikation an 19 Patienten untersuchten und eine Dosis von 300 Einheiten Botulinumtoxin Typ A als ausreichend ermittelten (Schurch et al., 2000; Stöhrer et al., 1999). Auch die Daten von zehn weiteren europäischen Zentren, die über eine große Erfahrung mit Botulinumtoxin Typ A Injektionen in den Detrusor verfügen und in einer Multicenterstudie mit 200 Patienten retrospektiv die Wirksamkeit von Botulinumtoxin Typ A bei neurogener Detrusorüberaktivität untersuchten, konnten bestätigt werden (Reitz et al., 2004a). Ferner konnte diese Technik erfolgreich zur Therapie von Kindern mit neurogenen Blasenfunktionsstörungen, verursacht durch Menigomyelozele, angewandt werden (Schulte-Baukloh et al., 2002). Auch dort wurde wie in dieser Arbeit ein Rückgang des maximalen Detrusordruckes und eine Zunahme des Reflexievolumens festgestellt (Schulte-Baukloh et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten sogar einen signifikanten Anstieg der Detrusorcompliance. Dies konnte jedoch weder durch die hier vorliegende noch eine andere Arbeit bestätigt werden (Reitz et al., 2004a; Reitz et al., 2004b; Schurch et al., 2000).

Von den behandelten Patienten konnten fünf nicht erfolgreich durch die durchgeführte Botulinumtoxin Typ A Injektion therapiert werden. Sie zeigten keine Anzeichen der Besserung, weder klinisch noch urodynamisch. Eine spezifische Erklärung dafür ist nicht bekannt, es ist jedoch auffällig, dass drei der fünf Patienten bei denen die Therapie nicht anschluss, bereits vor Injektion eine deutlich verminderte Detrusorcompliance von 4-12 ml/cmH₂O aufwiesen.

5.2. Beurteilung der ultrastrukturellen Ergebnisse der Muskulatur

Die ultrastrukturellen Ergebnisse der untersuchten Proben vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion sind vergleichbar mit denen von Proben, die in anderen Studien zu neurogener Blasenfunktionsstörung gefunden wurden (Elbadawi et al., 2003; Haferkamp et al., 2003a). Sowohl in den früheren Studien als auch in der jetzigen Untersuchung konnte das complete dysjunction pattern als Zeichen der Detrusorhyperaktivität und eine Abnahme der intermediate cell junctions zugunsten der intimate cell junctions beobachtet werden.

Die Struktur der Muskelfaszikel konnte in allen Proben als kompakt, intermediate oder beides identifiziert werden (Elbadawi et al., 2003a). Ferner gab es keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Struktur der Muskelfaszikel zwischen den beiden Gruppen I und II. Insbesondere auch nicht bei den Patienten, von denen Proben vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion entnommen wurde. Ebenso wie kein Unterschied in der Muskelzellstruktur zwischen beiden Gruppen festgestellt werden konnte, ergab sich auch kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gehaltes an interzellulärem Kollagen. Auch Unterschiede bei Zeichen der Muskelzelledegeneration wie ungeordnete sarkoplasmatische Filamente, dense bodies, sarkoplasmatische Vakuolen, Blasenbildung und Zellschrumpfung oder Zellzersplitterung konnten nicht nachgewiesen werden. Abermals bezog sich dies insbesondere auch auf Patienten, deren Probengewinnung vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion stattfand.

Da es keine vergleichbaren Studien zur Ultrastruktur von mit Botulinumtoxin Typ A Injektionen behandeltem Detrusorgewebe gibt, können die vorliegenden Daten nicht direkt verglichen werden. Ein Vergleich mit drei Studien, die sich mit der Struktur von quergestreifter Muskulatur nach Botulinumtoxin Typ A Injektion von Patienten mit Dystonie und mit essentiellen Blepharospasmus beschäftigen, ist aber möglich. (Borodic und Ferrante, 1992; Fertl et al., 2000; Harris et al., 1991). So konnte Fertl et al. demonstrieren, dass selbst bis zu 20 repetitive Botulinumtoxin Typ A Injektionen in den Musculus vastus lateralis keinerlei histologische Veränderungen in der Dichte der Muskelfasern auslösen (Fertl et al., 2000). In Studien von Harris et al. und Borodic et al., welche den Musculus orbicularis oculi untersuchten, konnte auch nach wiederholten Botulinumtoxin Typ A Injektionen keine bleibenden histologischen Änderungen der Muskelfasern, insbesondere aber keine Atrophie oder Degeneration nachgewiesen werden (Borodic und Ferrante, 1992; Harris et al., 1991). Obwohl die Ergebnisse dieser Studien nicht direkt übertragbar sind, da sie an quergestreifter Muskulatur durchgeführt worden sind, decken sie sich doch mit den hier gefundenen Ergebnissen. Es wurde ebenfalls keine Veränderung der

Muskelzellen nach Botulinumtoxin Typ A Injektion gefunden. Die Tatsache, dass nur drei Patienten eine wiederholte Behandlung mit Botulinumtoxin Typ A Injektion erhielten, kann aber lediglich ein Hinweis darauf sein, dass dies keine Veränderungen hervorruft. Es ist nicht auszuschließen, dass Veränderungen zu einem späteren Zeitpunkt noch auftreten, obwohl dafür bisher keinerlei Anzeichen bestehen.

Zusätzlich scheinen die Botulinumtoxin Typ A Injektionen keinen Einfluss auf die Muskelzellverbindungen zu haben. Ähnlich wie in der ultrastrukturellen Studie des Detrusors von Patienten mit neurogener Blasenfunktionsstörung von Haferkamp et al. waren sogenannte ICA's, die Muskelzellen zu kettenartigen Verbindungen verknüpften, außer in einer Probe die dominierende Form der Zellverbindung (Haferkamp et al., 2003a). Diese ICA's representieren das strukturelle Korrelat zu der klinisch bei allen Patienten manifesten Detrusorüberaktivität (Haferkamp et al., 2003a). Es wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl oder Art der Muskelzellverbindungen vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion gefunden, was impliziert, dass Botulinumtoxin Typ A keinen Einfluss auf diese hat.

5.3. Beurteilung der ultrastrukturellen Ergebnisse der Nerven

Die Hauptwirkung des Botulinumtoxins Typ A liegt in der Beeinflussung der Signalübertragung im Bereich der neuromuskulären Endplatte (Kao et al., 1976). Das Toxin wird durch Bindung an spezifische Rezeptoren cholinergischer Nervenendigungen in die präsynaptische Membran aufgenommen und dann innerhalb der Zelle gespalten (Schulte-Baukloh und Knispel, 2004). Das eigentliche Toxin, eine Endoprotease spaltet dann Aminosäuren von Proteinen des Fusionskomplexes, der die Verschmelzung der Acetylcholin enthaltenden Vesikel mit der präsynaptischen Membran steuert. So können die Acetylcholinvesikel nicht ausgeschüttet werden und es kommt zu einer schlaffen Lähmung und Muskelzelldenervation (Schulte-Baukloh und Knispel, 2004; Van Putten et al., 2002). Bezüglich quergestreifter Muskulatur konnte im Tierexperiment nach Injektion von Botulinumtoxin Typ A in den Musculus rectus lateralis von Ratten keine Degeneration oder Zerstörung von Motoneuronen festgestellt werden (Gomez-Ramirez et al., 1999). Auch ließ sich nach Botulinumtoxin Typ A Injektionen in den Musculus tibialis anterior und extensor digitorum longus und nachfolgender Untersuchung des Rückenmarkes von Ratten keine Veränderung zur Kontrollgruppe feststellen (White et al., 2000). Spezifische Daten bezüglich der Denervierung der glatten Muskulatur des Detrusors nach Botulinumtoxin Typ A Injektionen liegen ebenfalls nur aus dem Tierexperiment vor. So konnte

Smith et al. eine signifikante Abnahme der Acetylcholinausschüttung von 58% nach Feldstimulation im fünf Tage zuvor mit Botulinumtoxin Typ A behandelten Rattendetrusor nachweisen (Smith et al., 2003). Es gibt bisher aber keine Studie, welche die Nervendegeneration oder Motorneuronzerstörung nach Botulinumtoxin Typ A Injektion in den Detrusor untersucht hat.

Wie in bereits durchgeführten ultrastrukturellen Untersuchungen von Patienten mit neurogenen Blasenfunktionsstörungen und Detrusorüberaktivität (Haferkamp et al., 2003b) wiesen auch in dieser Arbeit die meisten der Axonpreterminals und Axonendkolben Zeichen der Degeneration schon vor der Behandlung mit Botulinumtoxin Typ A auf. Allerdings zeigte sich auch kein Anstieg der degenerierten Axonpreterminals und Axonendkolben nach der Behandlung mit Botulinumtoxin Typ A.

Ebenfalls wurden Zeichen der axonalen Regeneration wie copeptiderge und knospende Axonpreterminals und Axonendkolben in 17 von 21 Proben entdeckt. Diese axonale Regeneration wurde auch in einer vorherigen Arbeit zur Ultrastruktur des Detrusors von Patienten mit neurogener Detrusorhyperaktivität als charakteristisches Muster für dieses Patientengut beschrieben (Haferkamp et al., 2003b).

Von 309 untersuchten Axonprofilen konnten nur vier Axonendkolben als knospend identifiziert werden. Dabei gehörte ein Axonendkolben zur Gruppe I und drei zur Gruppe II. Dieses Ergebnis ist im Vergleich zu Untersuchungen an quergestreifter Muskulatur, die mit Botulinumtoxin Typ A behandelt wurde, sehr überraschend.

So konnte Holds et al. bei Untersuchungen am Musculus orbicularis oculi von Patienten, die aufgrund von Strabismus und essentiellen Blepharospasmus wiederholte Botulinumtoxin Typ A Injektionen erhielten, ein charakteristisches Aussprossen von Axonen zeigen. Dies konnte schon nach sechs Wochen dargestellt werden, hielt jedoch über den klinischen Effekt des Botulinumtoxins Typ A bis zu drei Jahren an (Holds et al., 1990). Schäfer et al. zeigte im Tierexperiment ähnliche Ergebnisse im Musculus soleus von Mäusen, der mit Botulinumtoxin Typ A behandelt wurde (Schafer und Wernig, 1998). Und auch Juzans et al. wies im Musculus levator auris longus von Mäusen ein Aussprossen von Axonen nach Botulinumtoxin Typ A Injektionen nach (Juzans et al., 1996). De Paiva konnte im mit Botulinumtoxin Typ A behandelten Musculus sternocleidomastoideus der Maus in vivo sowohl eine Aussprossung von Axonen feststellen als auch eine neuromuskuläre Transmission 8-28 Tage nach Injektion messen (de Paiva et al., 1999). Zu diesem Zeitpunkt war die Acetylcholinausschüttung der

ursprünglichen Nervenendigungen immer noch durch Botulinumtoxin Typ A blockiert (de Paiva et al., 1999). Danach, so konnte van Putten et al. im menschlichen Musculus extensor digitorum brevis nach Botulinumtoxin Typ A Injektion zeigen, schließt sich eine zweite Phase an. In dieser Phase 60 bis 80 Tage nach Injektion beginnt eine erneute Acetylcholinausschüttung an den ursprünglichen Nervenendigungen und die neu ausgesprossenen Axone bilden sich zurück (Van Putten et al., 2002).

Warum im Gegensatz zu den entsprechenden Literaturangaben in dieser Arbeit nur drei knospende Axone in der Gruppe II gefunden wurden bleibt unklar. Allerdings kann der Zeitraum zwischen der Botulinumtoxin Typ A Injektion und der Biopsieentnahme aus dem Detrusor als Grund für ein Fehlen von knospenden Axonen ausgeschlossen werden. Der Zeitraum der Biopsieentnahme dieser Studie erstreckt sich von sechs Wochen bis 22 Monate nach der Injektion und deckt damit beinahe die gesamte Periode ab, in der knospende Axone im Menschen beobachtet wurden (Holds et al., 1990). Haferkamp et al. konnte eine geringe axonale Regeneration und insbesondere knospende Axone sowie eine ausgeprägte axonale Degeneration im Detrusor von Patienten mit Detrusorhyperaktivität bei neurogener Blasenfunktionsstörung nachweisen (Elbadawi et al., 2003; Haferkamp et al., 2003a; Haferkamp et al., 2003b). Diese axonale Regeneration fand sich ohne eine Therapie mit Botulinumtoxin Typ A. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die drei knospenden Axonendkolben der Gruppe II auch ohne die Anwendung von Botulinumtoxin Typ A aufgetreten sein könnten und die Injektionen gar keinen Einfluss auf das Aussprossen der Axone hatten.

5.4. Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten

Bei einem Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, insbesondere dem Fehlen von aussprossenden Axonen, mit denen der Literatur müssen einige fundamentale Unterschiede dieser Studie zu den anderen Studien beachtet werden.

Erstens ist es mangels Studien an glatter Muskulatur nötig, die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Wirkung von Botulinumtoxin Typ A Injektionen in den glattemuskulären Detrusor mit denen von Arbeiten, wobei Botulinumtoxin Typ A in quergestreifte Muskulatur injiziert wurde, zu vergleichen. Obwohl in allen Studien die gleichen klinischen Effekte, eine Lähmung des Muskels, in den das Toxin injiziert wurde, gefunden wurde, bleibt doch unklar ob in glatter und quergestreifter Muskulatur auch die gleichen ultrastrukturellen Veränderungen auftreten.

Zweitens sind die meisten Studien zur Ultrastruktur der quergestreiften Muskulatur, die ein axonales Aussprossen aufgrund von Botulinumtoxin Typ A Injektionen beobachtet haben, entweder an ansonsten gesunden Versuchstieren (de Paiva et al., 1999; Juzans et al., 1996; Schafer und Wernig, 1998), oder an Patienten mit benignem essentiellen Blepharospasmus (Borodic und Ferrante, 1992; Holds et al., 1990) durchgeführt worden. Diese Versuchstiere und Patienten hatten im Vorfeld der durchgeführten Botulinumtoxin Typ A Injektion in die quergestreifte Muskulatur eine normale Innervation dieser Muskulatur mit intakten Axonpreterminalen und Axonendkolben. Damit spiegeln diese Untersuchungen nach Botulinumtoxin Typ A Injektionen eine Denervierung des peripheren Nervensystems wieder. Dieses, so konnte Barisic et al. an Kindern mit akzidentiellen oder kriegsbedingten peripheren Nervenverletzungen zeigen, besitzt eine große Kapazität für axonale Regeneration (Barisic et al., 1999). Auch konnte Kamijo et al. an verletzten Fazialisnerven von Mäusen eine große Regenerationsfähigkeit der beschädigten Axone des peripheren Nervensystems nachweisen (Kamijo et al., 2003). Es besteht damit ein Gegensatz zu den in dieser Arbeit ausgewerteten Detrusorbiopsien. Dort konnten bei ungefähr 70% der untersuchten Axonpreterminalen und Axonendkolben schon vor der Injektion des Botulinumtoxins Typ A Zeichen der Degeneration festgestellt werden. Damit bestand bei den untersuchten Patienten neben der partiellen Denervierung des peripheren Nervensystems durch Botulinumtoxin Typ A eine Läsion des zentralen Nervensystems. So litten die Patienten entweder an einer traumatischen Querschnittslähmung, Myelomenigozele, Myelitis oder idiopathischer Rückenmarksischämie. Es scheint daher durchaus annehmbar, dass die fehlende axonale Regenerationskapazität nach Verletzungen im zentralen Nervensystem höherer Wirbeltiere (Bomze et al., 2001; Bregman et al., 1995; Frey et al., 2000; Schwab, 1990) für die mangelnde Regeneration und das fehlende axonale Aussprossen in der Gruppe II dieser Arbeit verantwortlich sind.

Frey et al. zeigte in Experimenten an Mäusen, dass die beiden Wachstumsproteine GAP-43 und CAP-23, mit dem kortikalen Zytoskelett verbundene und Calmodulin bindende Proteine, eine maßgebliche Rolle in der Regulation des axonalen Aussprossens besitzen. Diese beiden Proteine sind nach einer Verletzung des zentralen Nervensystems vermindert. Bomze et al. konnte jedoch im Tierexperiment durch Expression von GAP-43 und CAP-23 in Mäusen mit Rückenmarksverletzung eine effektive Stimulation der axonalen Regeneration im zentralen Nervensystem zeigen (Bomze et al., 2001). Bisher liegen aber keine Studien vor, welche die Expression dieser beiden Wachstumsproteine im durch Rückenmarksverletzung denervierten

Detrusor untersuchen. Es scheint jedoch möglich, dass neben einer Verminderung dieser beiden Wachstumsproteine im Rückenmark auch eine Verminderung im Detrusor der entsprechenden Patienten besteht. Dies würde die fehlende axonale Regeneration erklären.

Einen weiteren Faktor, der für das Aussprossen von Motoneuronen notwendig ist, stellt der ciliary neurotrophic factor (CNTF) dar. Dies konnte durch Siegel et al. anhand von knockout Mäusen, die diesen Faktor nicht besaßen und einer Kontrollgruppe gezeigt werden, aufgrund der unterschiedlichen Nervenregeneration des Musculus gastrocnemius (Siegel et al., 2000). Dieser Faktor kann jedoch nicht für das fehlende axonale Aussprossen in dieser Arbeit verantwortlich gemacht werden. So konnte Vizard et al. einen Anstieg der ciliary neurotrophic factor mRNA im Detrusor von Ratten nach Rückenmarksverletzung nachweisen, das noch eher ein Aussprossen von Axonen, wie im quergestreiften Muskel beschrieben, erwarten ließe (Vizzard, 2000).

In klinischen Studien zur Behandlung von Blepharospasmus durch Botulinumtoxin Typ A Injektionen durch Scott et al. und Borodic et al. wurde eine Wirkdauer des Effektes von zwei bis vier Monaten beschrieben (Borodic und Cozzolino, 1989; Scott et al., 1985). Ein Vergleich der Länge der Wirkdauer des Botulinumtoxin Typ A Effektes zwischen diesen beiden Studien und dieser Arbeit ist aufgrund von unterschiedlichen Mengen des gebrauchten Toxins und unterschiedlichen Muskelarten (glatt, quergestreift) sicherlich begrenzt. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die längere Wirkdauer von Botulinumtoxin Typ A im Detrusor in dieser Arbeit durch das fehlende Aussprossen von Axonen und die damit unterbliebene funktionelle Regeneration erklärt werden kann.

5.5. Fazit

Zusammenfassend konnte die klinische und urodynamische Wirksamkeit von Botulinumtoxin Typ A Injektion bei neurogener Blasenfunktionsstörung mit Detrusorüberaktivität bestätigt werden. Weiterhin konnten keine ultrastrukturellen neuromuskulären Veränderungen des Detrusors vor und selbst nach wiederholter Injektion von Botulinumtoxin Typ A nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einigen an quergestreifter Muskulatur durchgeführten Studien konnte keine Zunahme von aussprossenden Axonen nach der Botulinumtoxin Typ A Injektion beobachtet werden. Dies weist auf eine andere pathophysiologische Reaktion auf das Toxin, entweder zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur oder aber zwischen verschiedenen Krankheitsbildern, hin.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Ultrastruktur des Detrusors von Patienten mit einer neurogenen Blasenfunktionsstörung und Detrusorhyperaktivität vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Ferner wurde die klinische Wirksamkeit dieser Therapiemethode durch urodynamische Messungen ermittelt.

Es wurden 30 Proben von 24 Patienten mit neurogener Detrusorüberaktivität gewonnen. Die Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei in Gruppe I 13 Proben vor und in Gruppe II sechs Proben innerhalb von drei Monaten nach Injektion und elf Proben bei nachlassender Wirkung des Botulinumtoxin Typ A untersucht wurden. Die Proben wurden anhand standardisierter Methoden aufgearbeitet und von zwei unabhängigen qualifizierten Untersuchern ohne vorherige Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit ausgewertet. Ferner wurden alle Patienten vor und nach der Injektion videourodynamisch anhand der Standards der ICS untersucht.

Die urodynamische Auswertung zeigte einen signifikanten Anstieg der Blasenkapazität ($p=0.003$) und eine signifikante Abnahme des maximalen Detrusordruckes ($p=0.001$). Die Detrusorcompliance veränderte sich nicht signifikant vor und nach Injektion. Fünf Patienten zeigten keine klinische Besserung, wobei drei dieser Patienten bereits vor Injektion eine stark eingeschränkte Detrusorcompliance hatten.

Ultrastrukturell konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Bezug auf Muskelfaszikelstruktur ($p=0.445$), interzelluläre Abstände ($p=0.482$) und Art sowie Anzahl der Muskelzellverbindungen ($p=0.443$) zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. In Gruppe I zeigten im Mittel 70% in Gruppe II im Mittel 66% der untersuchten Axonenkolben degenerative Veränderungen, wobei es ebenfalls keinen statistisch signifikant Unterschied gab ($p=0.840$). Von 309 untersuchten Axonen aus beiden Gruppen konnten ein Axon aus Gruppe I und drei Axone aus der Gruppe II als knospende Axone identifiziert werden ($p=0.728$).

In beiden Gruppen konnte nur eine begrenzte Anzahl an kollagenen Ablagerungen innerhalb des Interstitiums beobachtet werden.

Die Studie bestätigt die klinische und urodynamische Wirksamkeit von Botulinumtoxin Typ A Injektionen zur Therapie der Detrusorüberaktivität bei Patienten mit neurogener Blasenfunktionsstörung. Es wurden keine ultrastrukturellen neuromuskulären Unterschiede vor und nach Botulinumtoxin Typ A Injektion festgestellt. Auch wurde die in vorherigen Studien von Patienten mit neurogener Detrusorüberaktivität als typisch beschriebene ausgeprägte axonale Degeneration nachgewiesen. Im Gegensatz zu an quergestreifter Muskulatur durchgeführten Studien konnte nur eine stark eingeschränkte axonale Aussprossung beobachtet werden. Dies impliziert entweder einen pathophysiologischen Unterschied zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur oder aber zwischen verschiedenartigen Krankheitsbildern im Hinblick auf Botulinumtoxin Typ A Injektionen.

7. Bildanhang

7.1. Muskelzellen und Degeneration

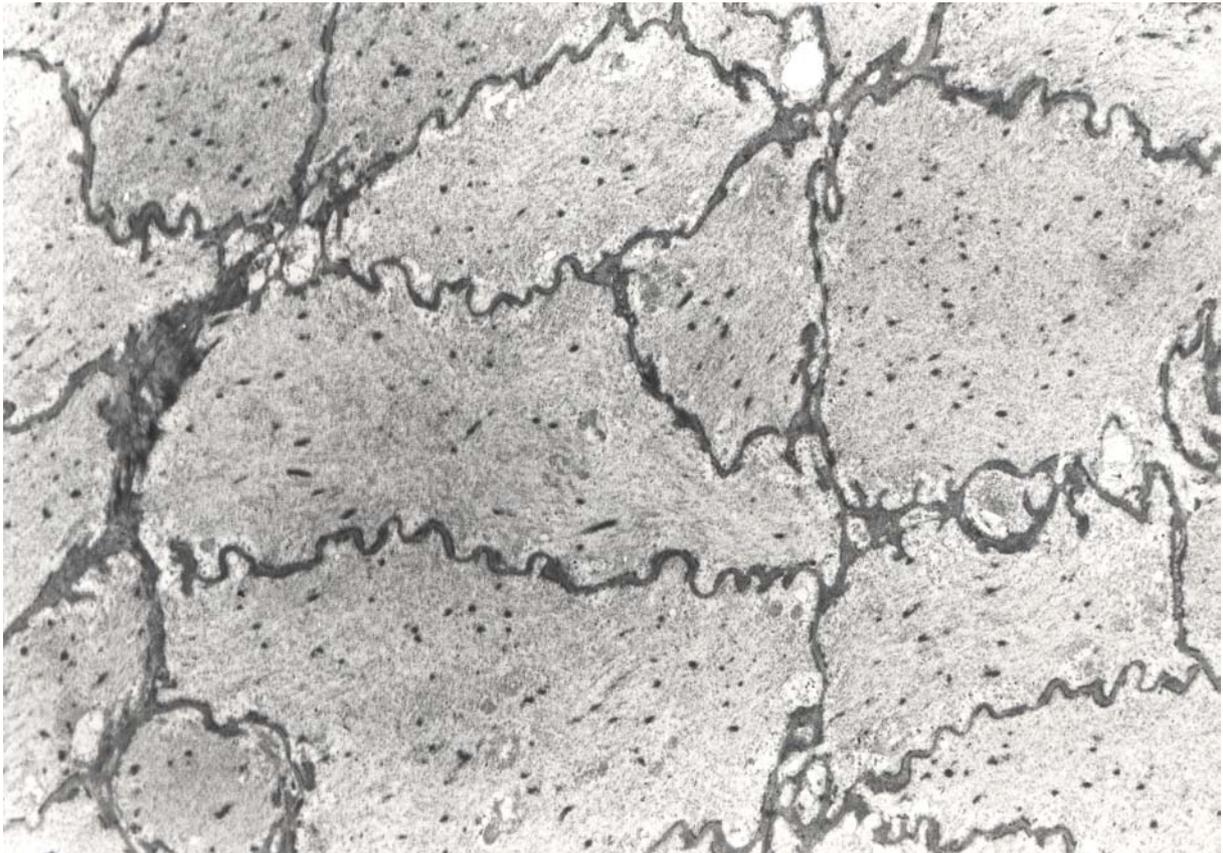


Abbildung 3: Muskelfaszikelstruktur der glatten Blasenmuskulatur. Eng aneinanderliegende Muskelzellen im „Compact“ Faszikel mit einem geringsten interzellulären Abstand von 80nm (Negativ Nr.:45629, Vergrößerung x7425)

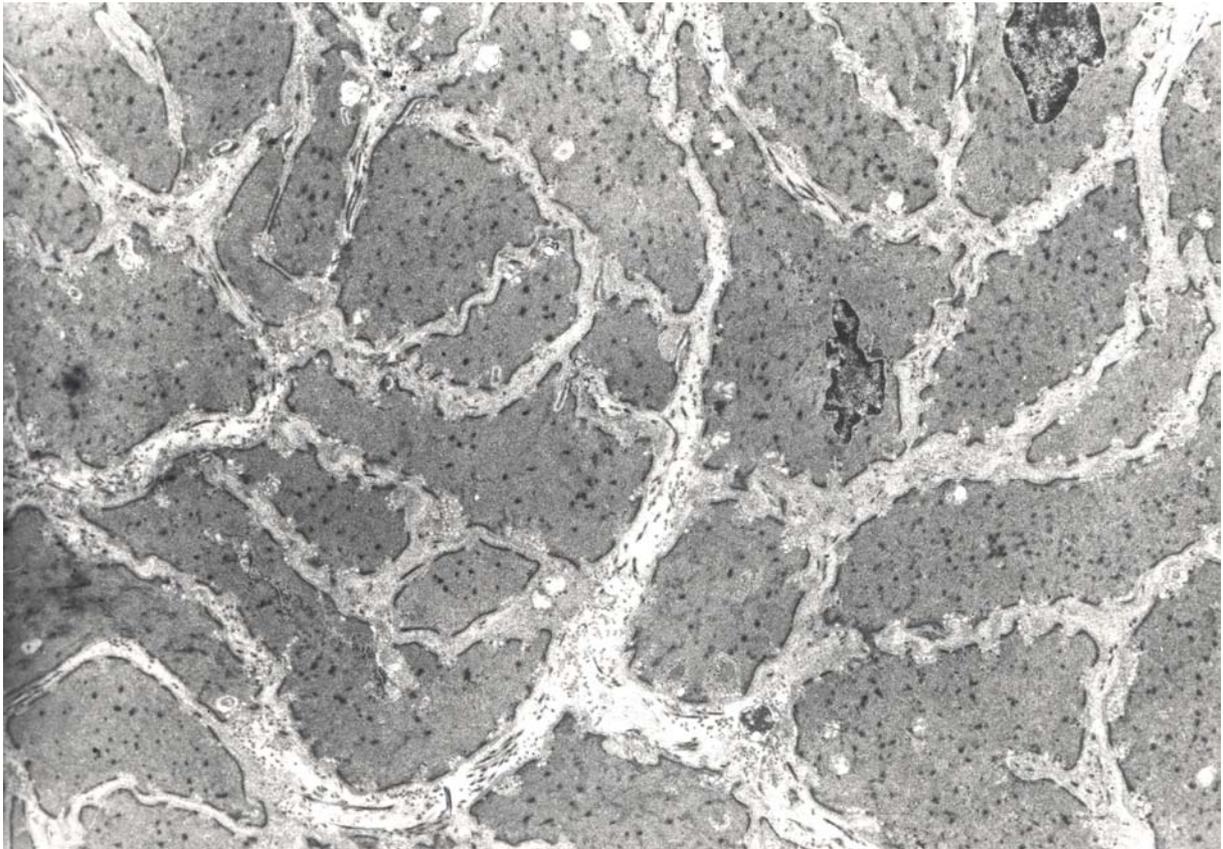


Abbildung 4: Muskelfaszikelstruktur der glatten Blasenmuskulatur. „Intermediate“ Faszikel mit geringradig erweiterten Muskelzellabständen. Geringster interzellulärer Abstand 203nm (Negativ Nr.: 45717, Vergrößerung x7425).

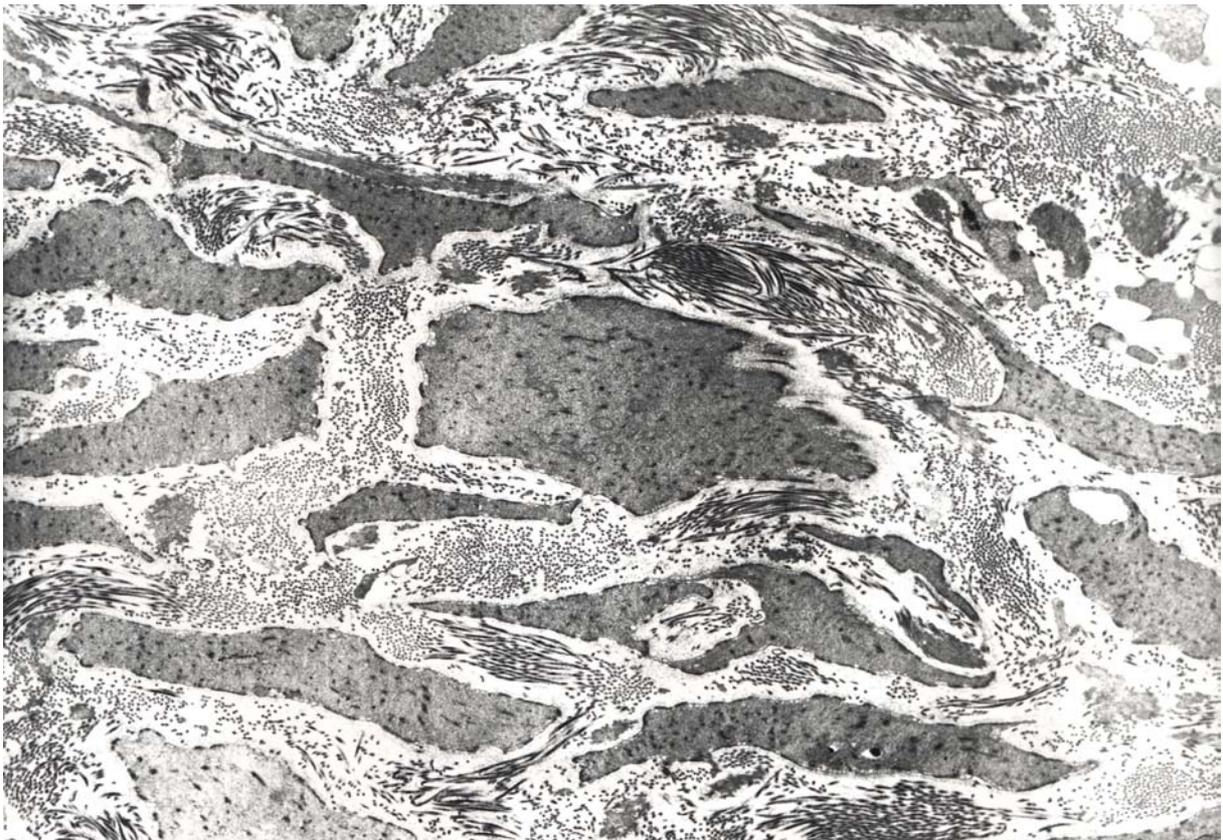


Abbildung 5: Muskelfaszikelstruktur der glatten Blasenmuskulatur. „Loose“ Faszikel mit ausgedehnter Zellseparierung und unregelmäßigen Zellabständen, sowie einem stark erhöhten interzellulären Kollagengehalt. Geringster interzellulärer Abstand von bis zu 800nm (Negativ Nr.: 45973, Vergrößerung x7965).

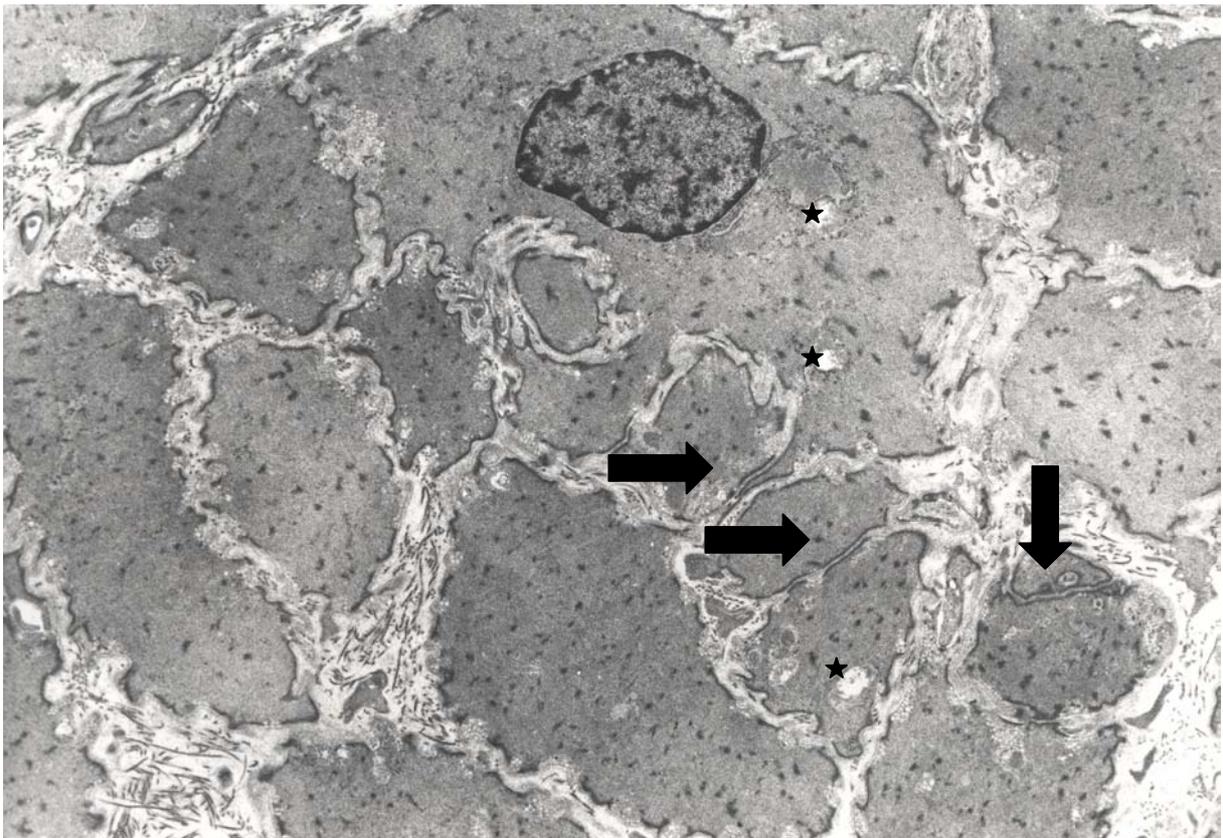


Abbildung 6: Muskelfaszikel der glatten Blasenmuskulatur. „Intermediate Faszikel mit gut erkennbaren Intermediate Cell Junctions (Pfeile) der normalen Blasenmuskulatur und geringradigen degenerativen Veränderungen innerhalb der Muskelzellen (Sterne) (Negativ 45722, Vergrößerung x7425).

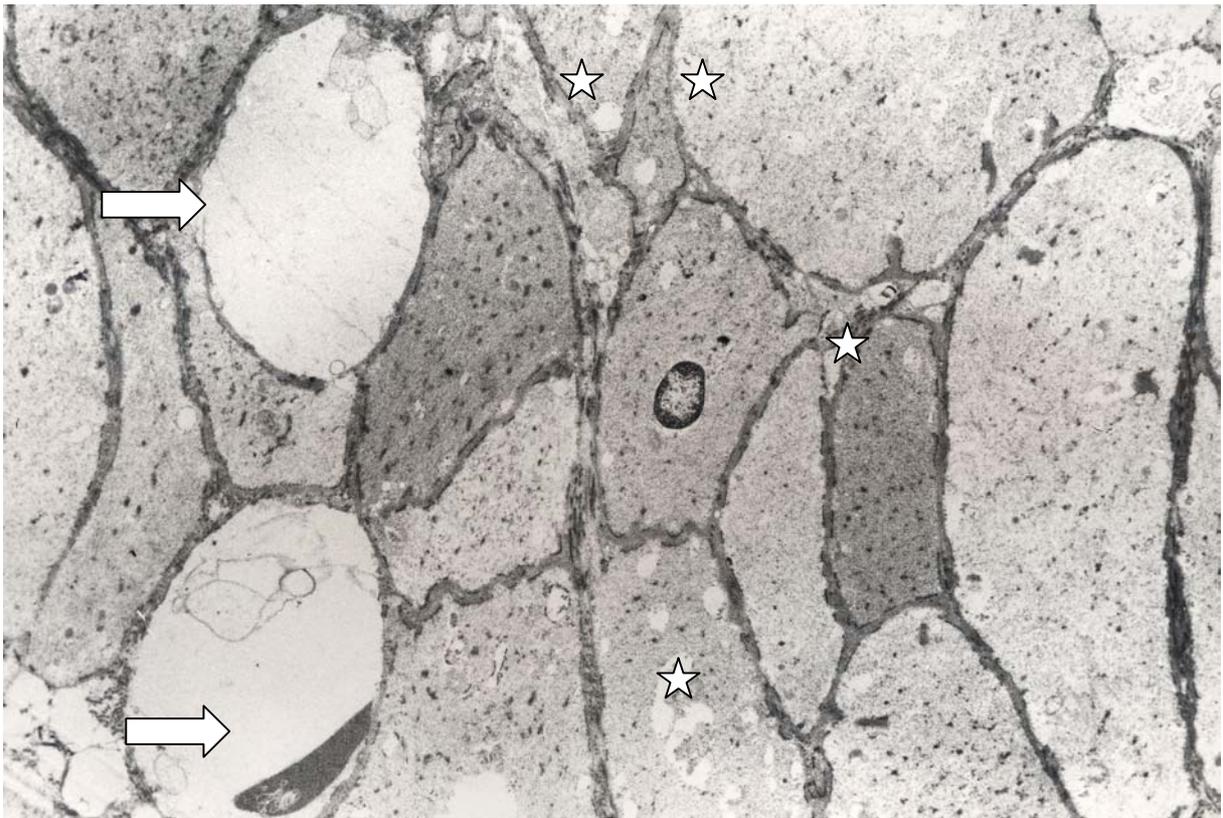


Abbildung 7: Kompakter Muskelfaszikel mit deutlichen Anzeichen der Degeneration angedeutet durch vakuolisiertes Sarkoplasma (Sterne) und zwei fragmentierte Muskelzellen mit Kernresten (Pfeile) (Negativ Nr.:45640, Vergrößerung x7425).

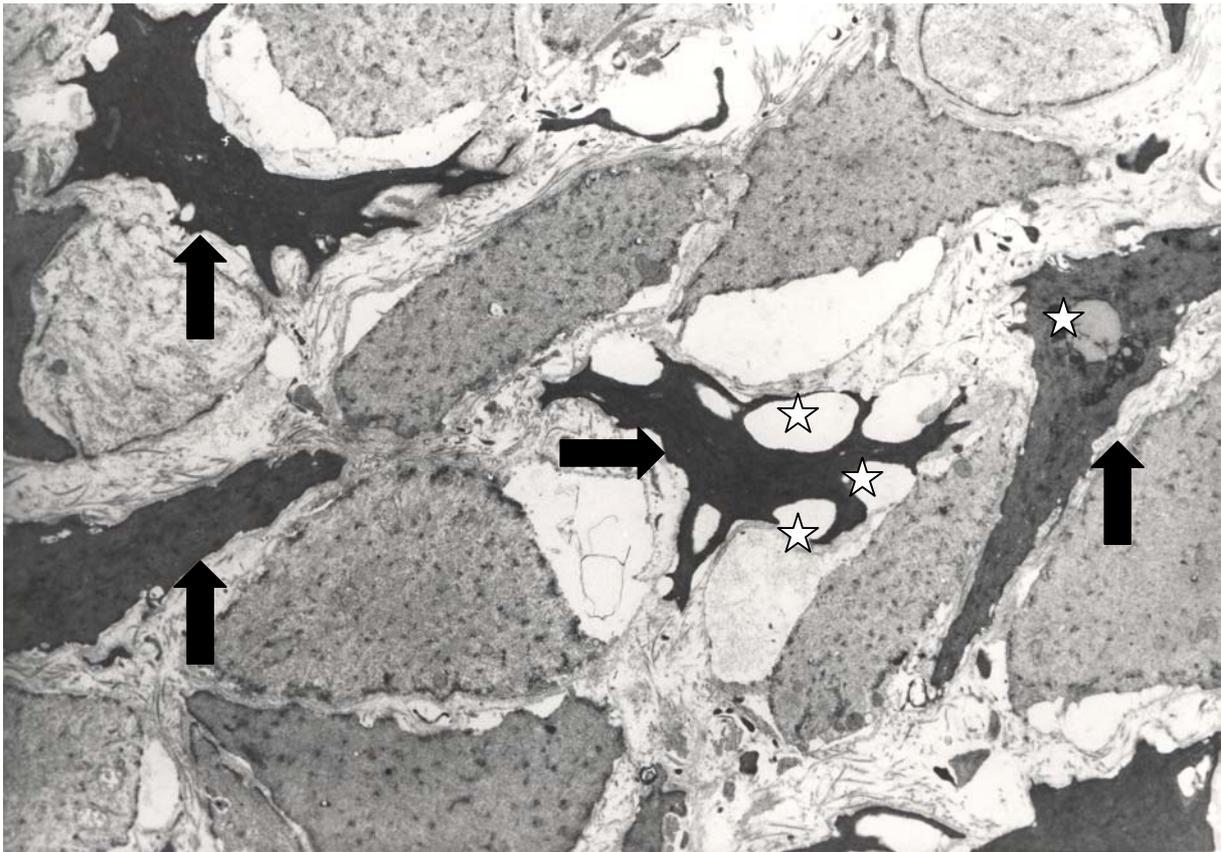


Abbildung 8: „Loose“ Faszikel mit ausgeprägter Degeneration. Im Vergleich zu den normalen Muskelzellen stark kondensiertes, elektronenmikroskopisch dichtes Zytoplasma von geschrumpften, degenerativen Muskelzellen (Pfeile). Vakuolenbildung innerhalb des Zytoplasmas (Sterne) (Negativ Nr.: 46684, Vergrößerung x7965.

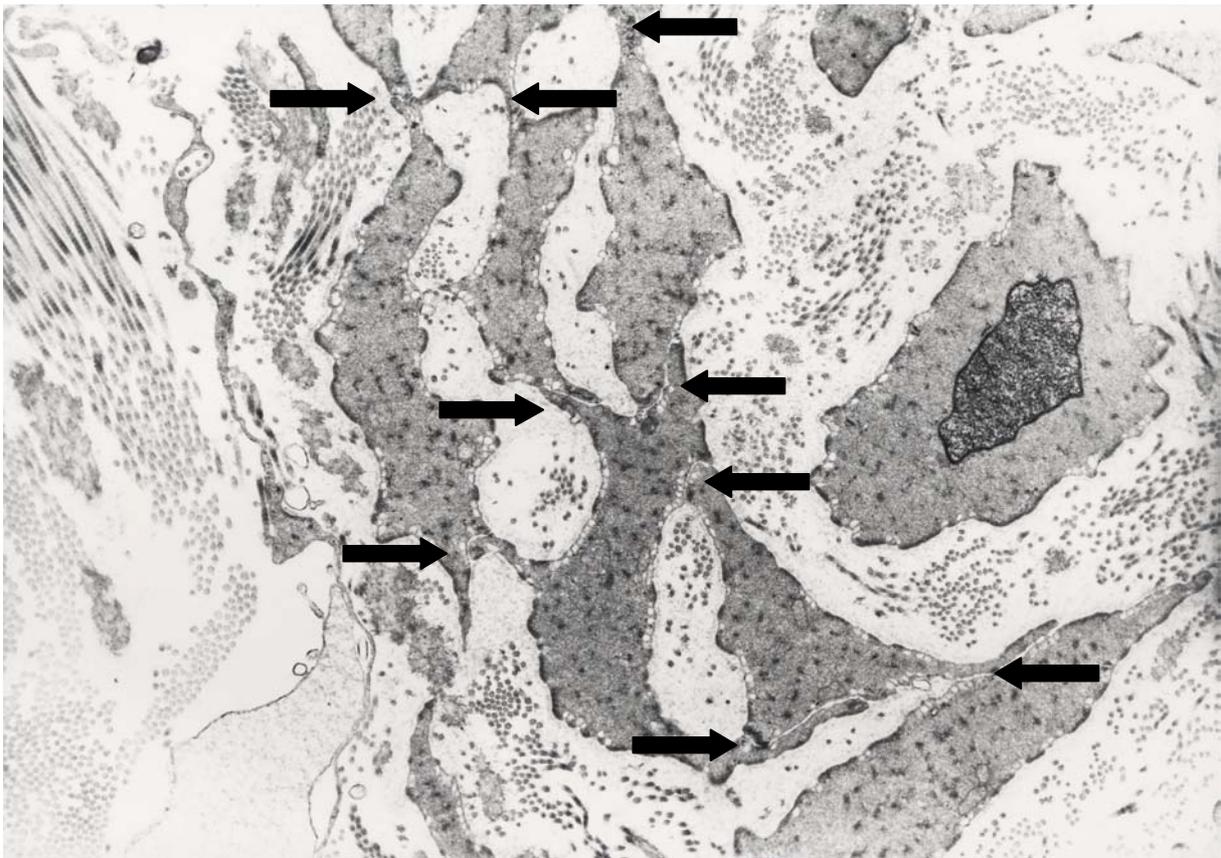


Abbildung 9: „Complete dysjunction pattern“ (CDP) 9 Muskelzellen sind durch intimate cell appositions (ICA) zu einer Kette verknüpft (Pfeile) (Negativ Nr.: 45995, Vergrößerung x 14040).

7.2. Muskelzellverbindungen

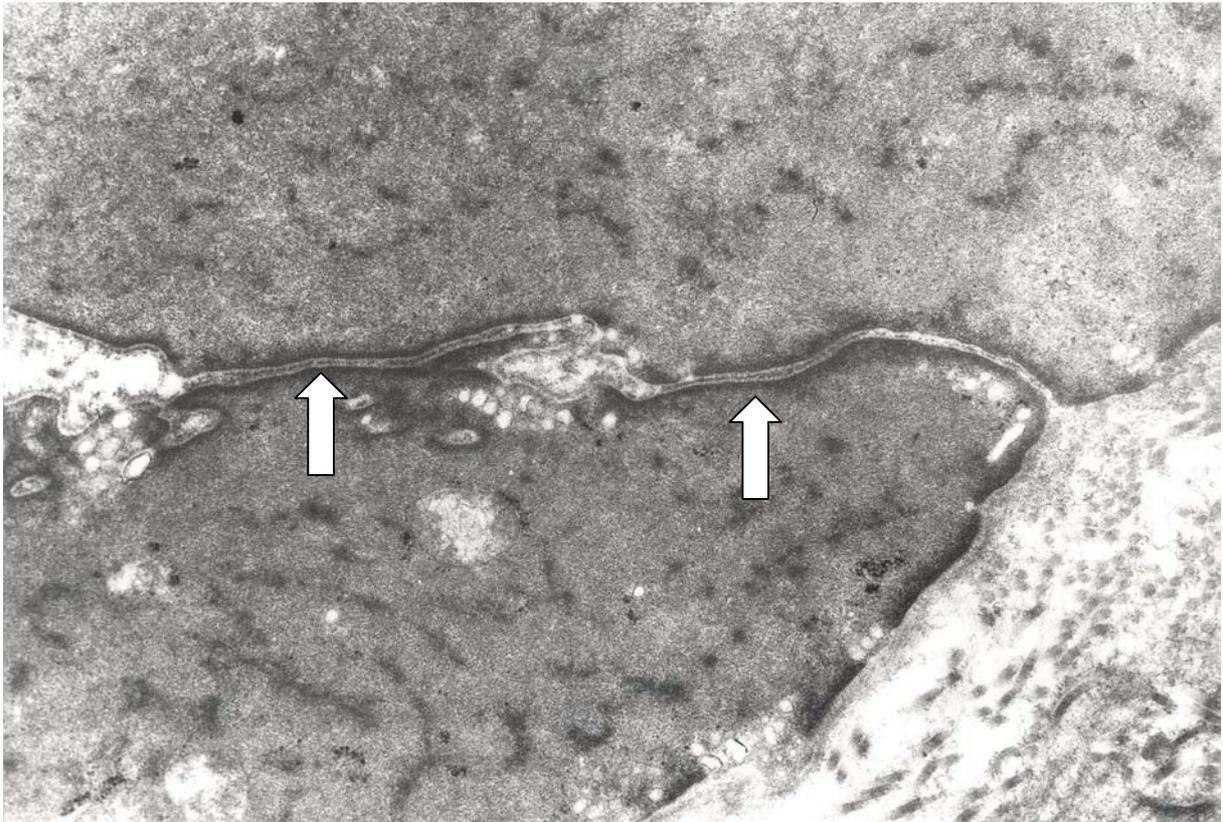


Abbildung 10: Normale Intermediate Cell Junctions (Pfeile) mit linearer zentraler Verdichtung und elektronenmikroskopisch dichten submembranösen Plaques (Negativ Nr.: 45688, Vergrößerung x26460).



Abbildung 11: Intermediate Cell Junction (Pfeil) sowie gut erkennbare dense bodies in den benachbarten Muskelzellen (Sterne) (Negativ Nr.: 45644, Vergrößerung x37800).

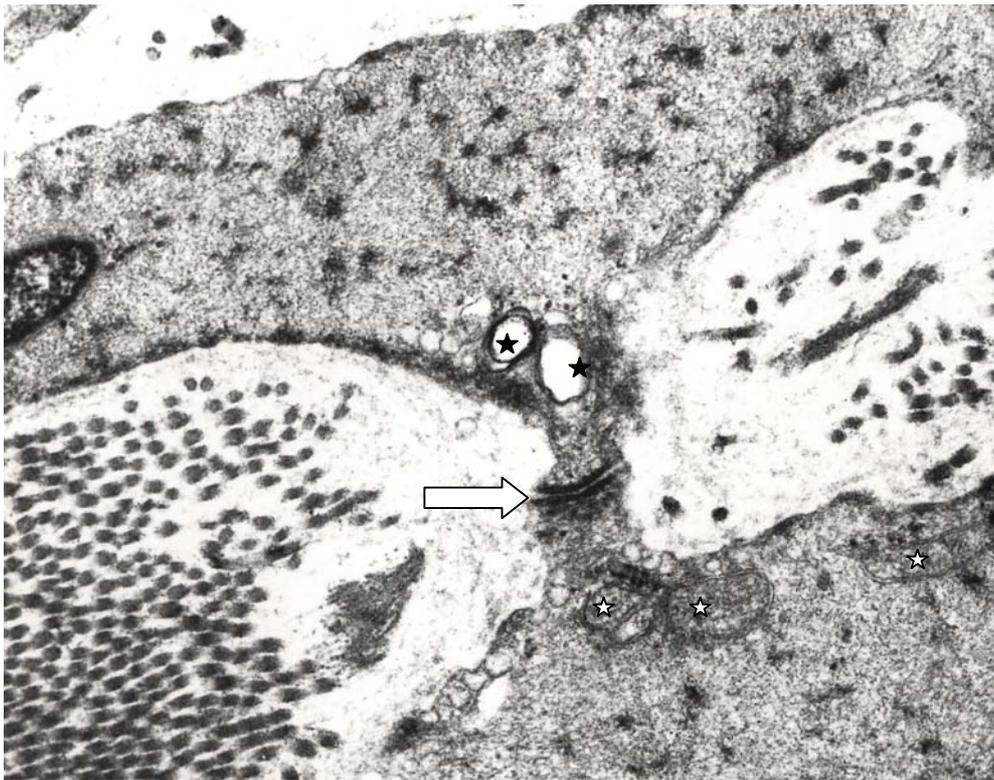


Abbildung 12: Sehr kurze Intermediate Cell Junction (Pfeil) bei sonst erweitertem Interzellularraum mit erhöhtem Kollagengehalt. Intakte Mitochondrien in der unteren Muskelzelle (helle Sterne) und aufgetriebene degenerierte in der oberen Muskelzelle (dunkle Sterne) (Negativ 45982, Vergrößerung x31050).

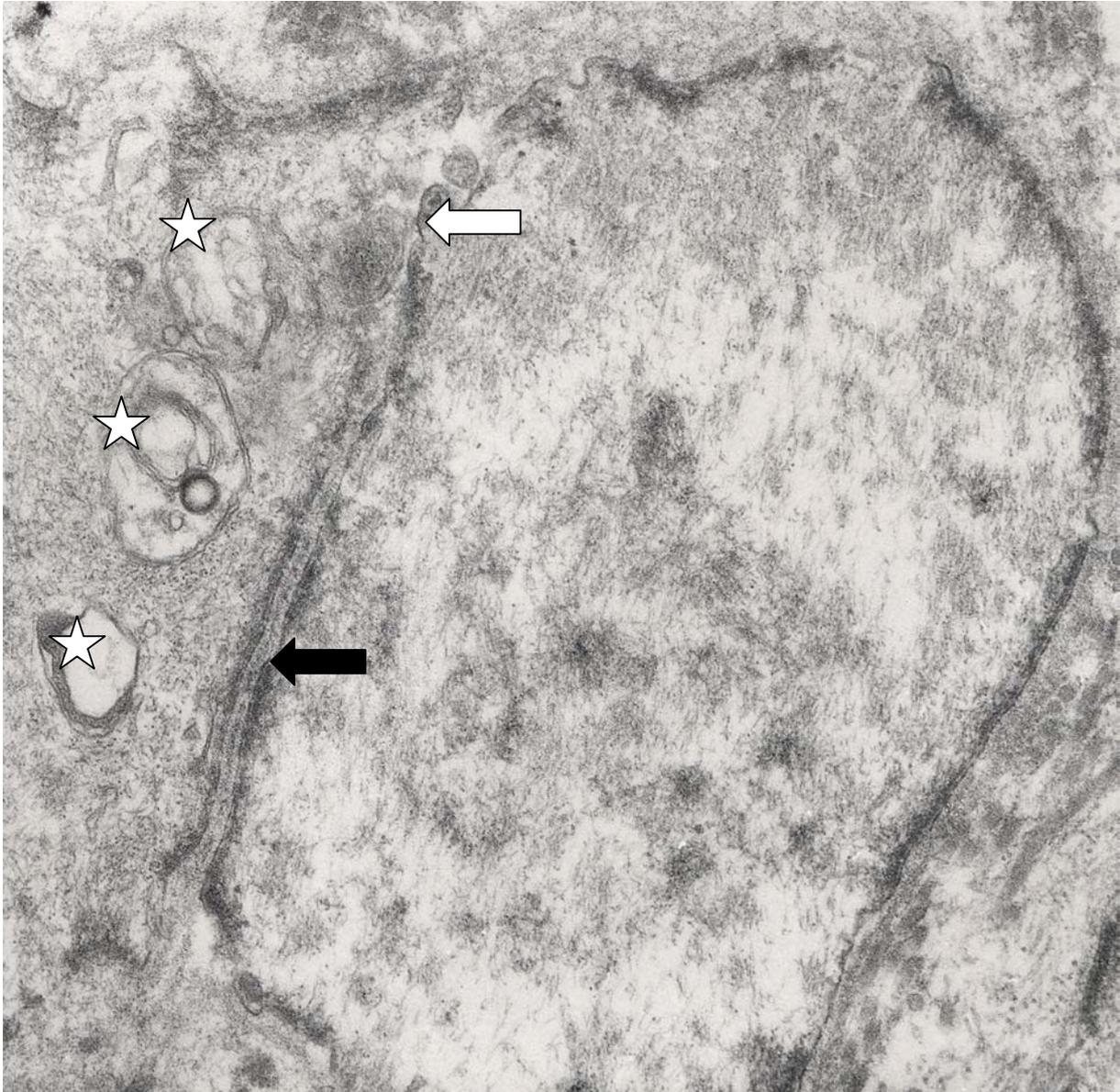


Abbildung 13: Intermediate Cell Junction (dunkler Pfeil) und Intimate Cell Apposition (heller Pfeil) kommen an einer Muskelzelle vor. Vakuolierte Mitochondrien als Zeichen der Degeneration (Sterne) (Negativ Nr.: 46705, Vergrößerung x31050).



**Abbildung 14: Intimate Cell Apposition mit Synzytium-ähnlichem Verschmelzen der Zellmembranen (Pfeil)
(Negativ Nr.:45255, Vergrößerung x48600).**

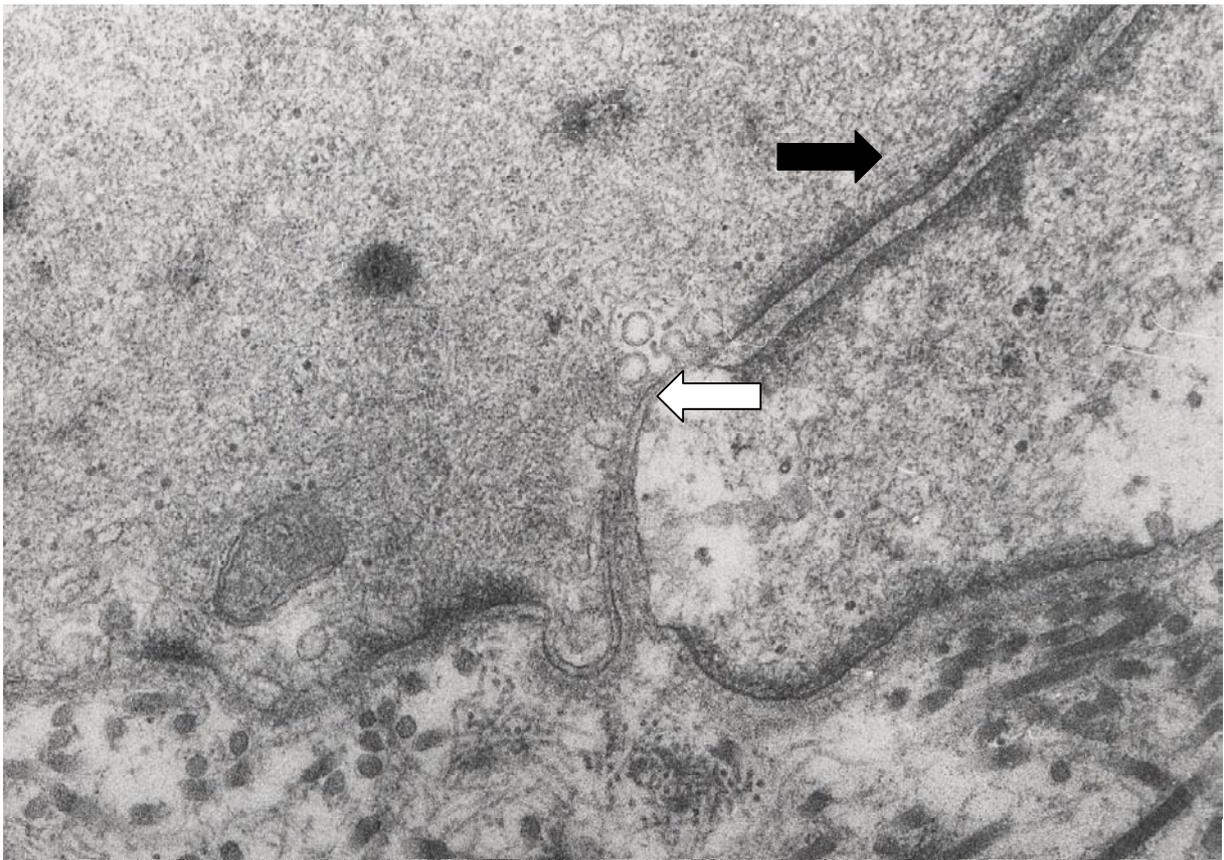


Abbildung 15: Intermediate Cell Junction (dunkler Pfeil) mit Übergang in eine Intimate Cell Apposition (heller Pfeil) (Negativ Nr.: 45263, Vergrößerung x37800).

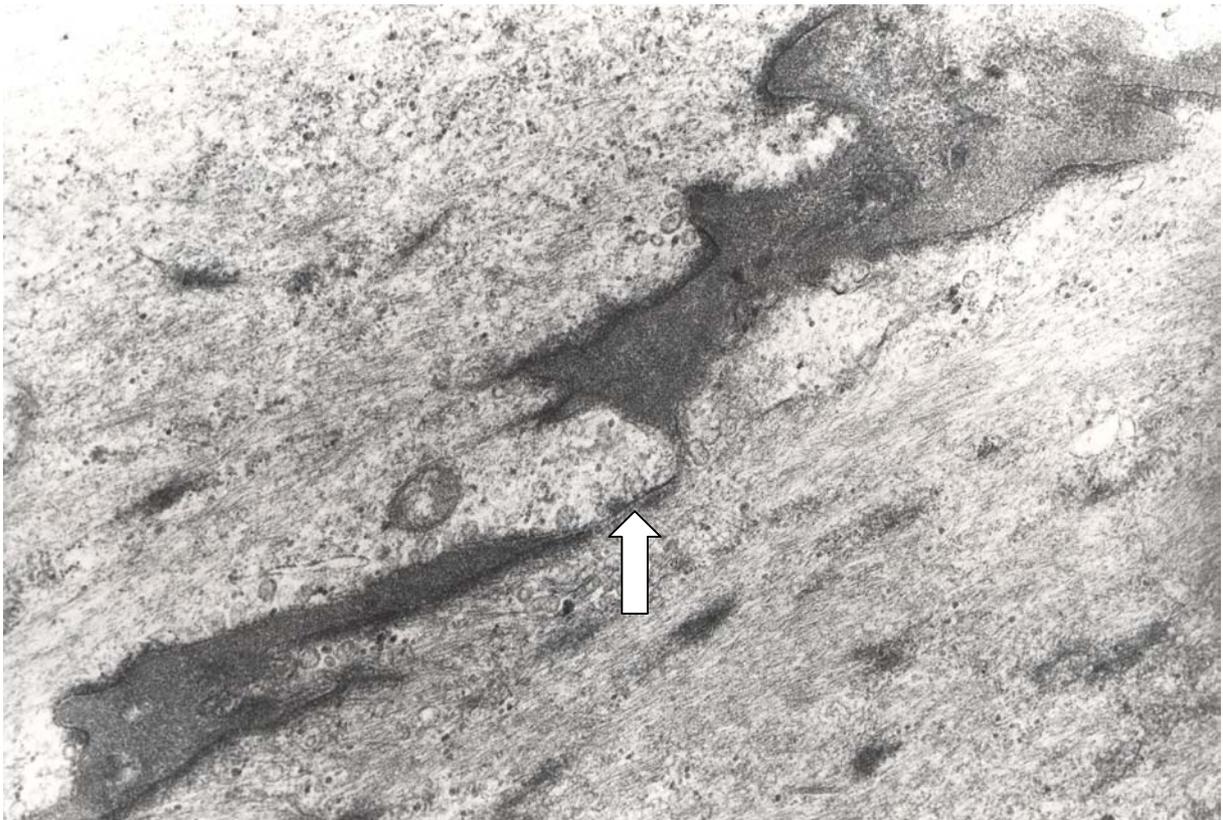


Abbildung 16: Breitbasige Intimate Cell Apposition (Pfeil) (Negativ Nr.: 45481, Vergrößerung x 37800).

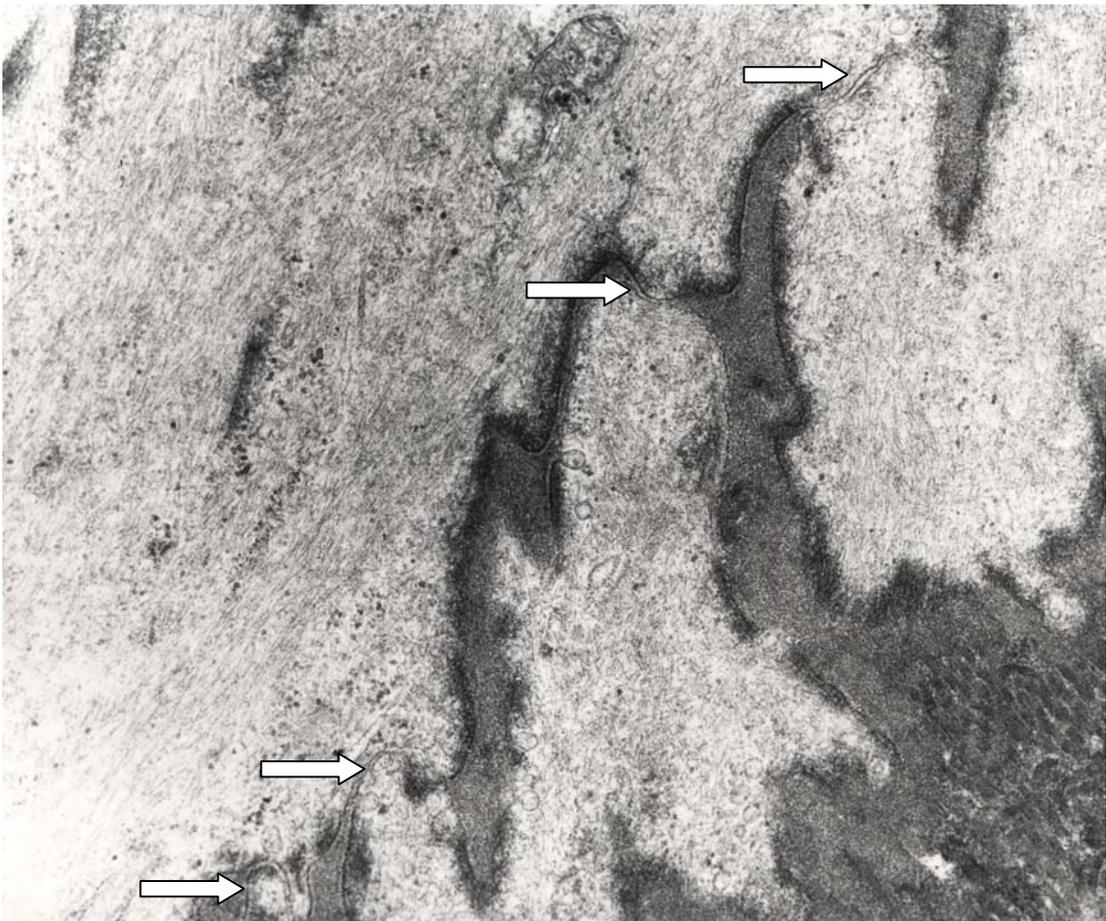


Abbildung 17: 4 Intimate Cell Appositions im Bereich einer einzigen Muskelzelle mit teilweise Synzytium-ähnlichem Charakter (Pfeile) (Negativ Nr.: 45512, Vergrößerung x37800).

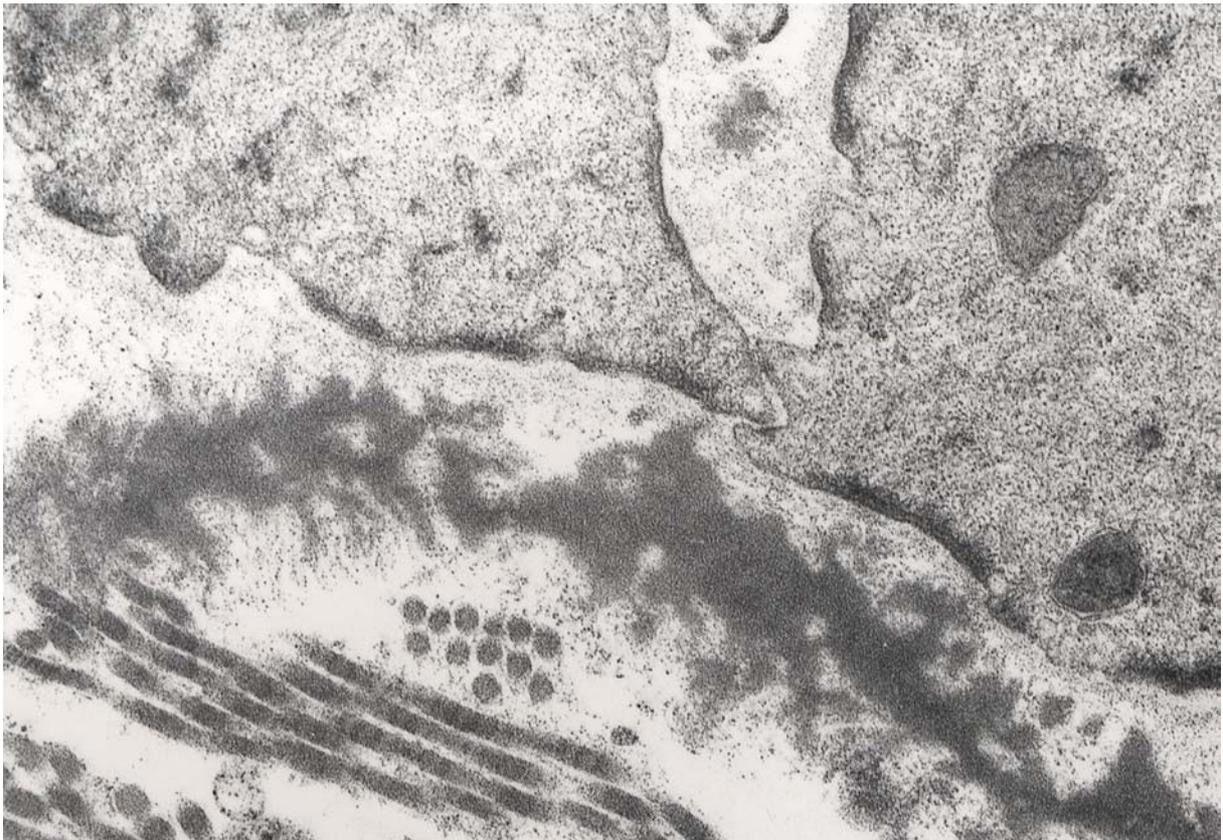


Abbildung 18: Fingerförmige Intimate Cell Apposition (Protrusion Junction) mit Einstülpung in das Zytoplasma der benachbarten Muskelzelle (Negativ Nr.: 46713, Vergrößerung x 31050).

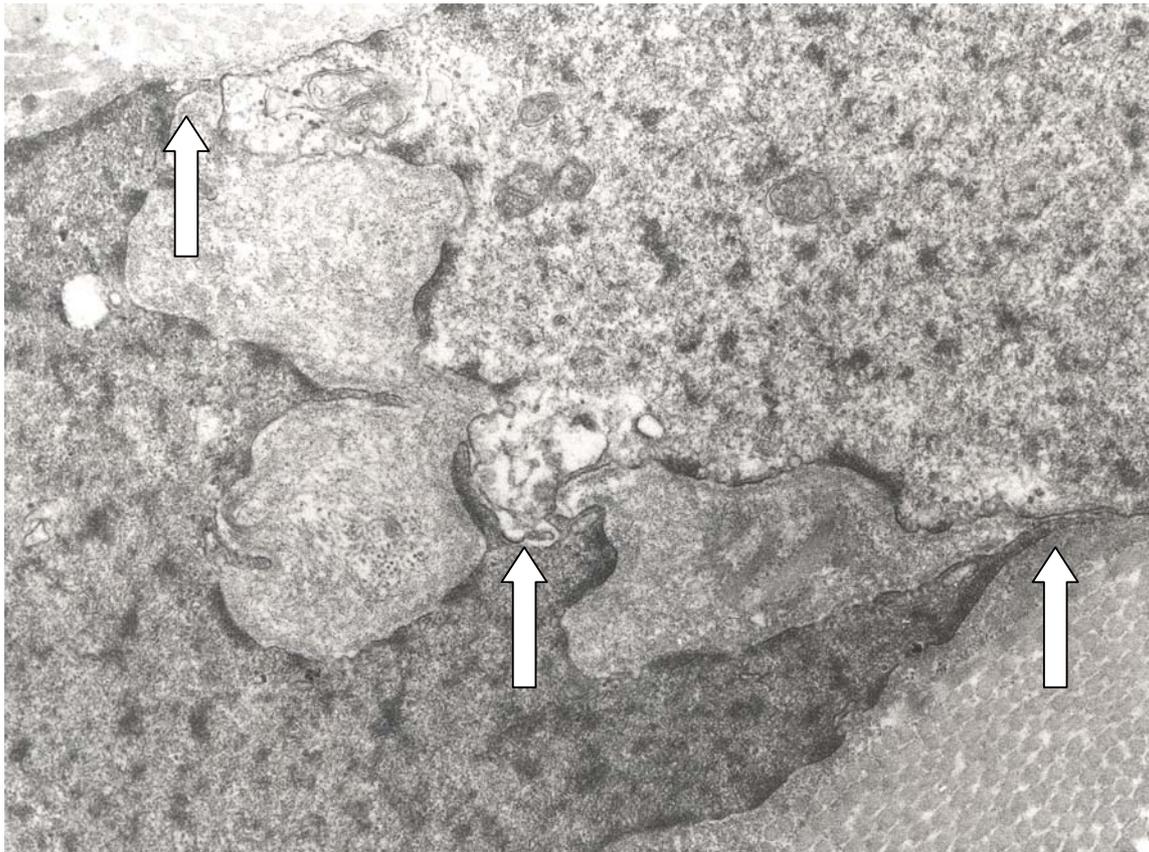


Abbildung 19: Fingerförmige Intimate Cell Appositions (Protrusion Junctions) zwischen benachbarten Muskelzellen (Pfeile) (Negativ Nr.: 46718, Vergrößerung x 31050).

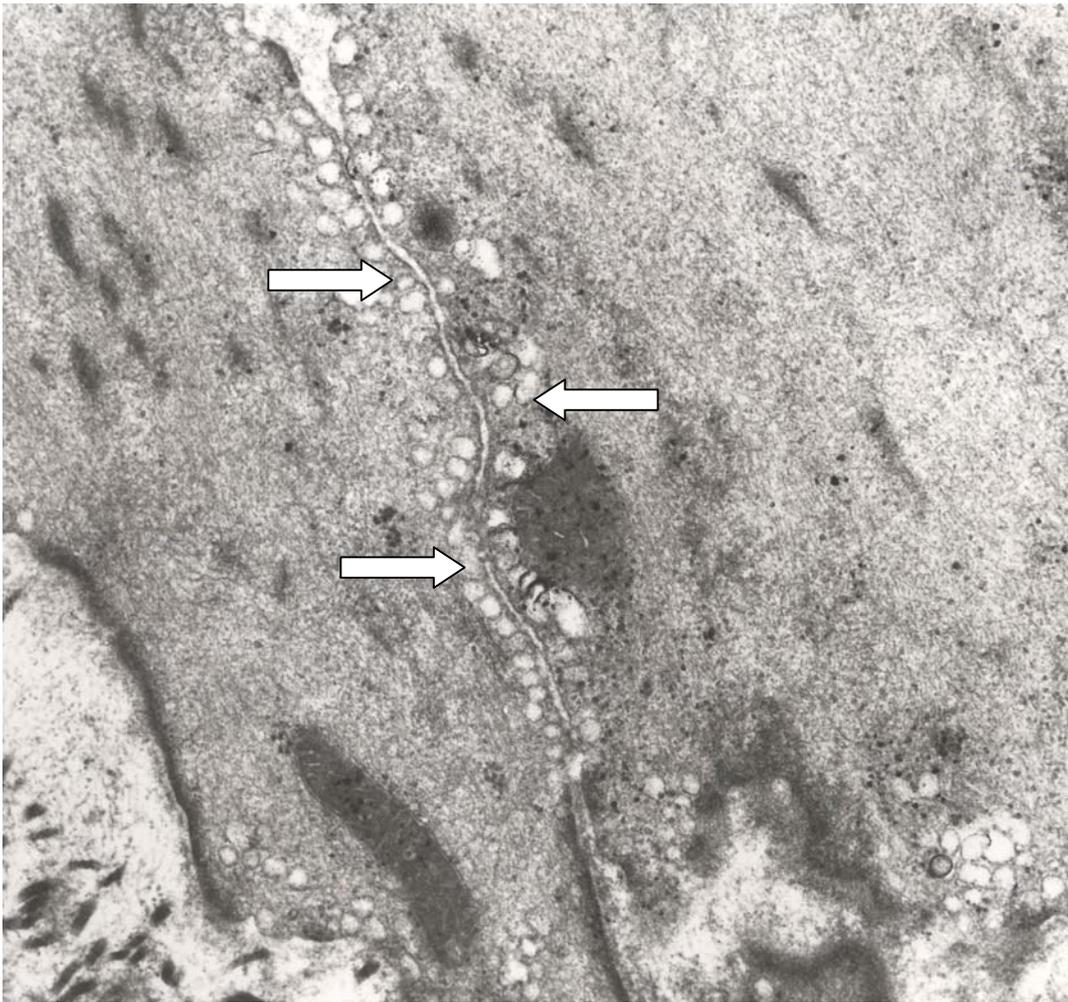


Abbildung 20: Langgestreckte Intimate Cell Apposition (Ultraclose Abutment) mit deutlich erkennbaren submembranösen Caveolen der normalen Blasenmuskulatur (Pfeile) (Negativ Nr.: 46077, Vergrößerung x31050).

7.3. Nervenzellen und Schwann'sche Zellen

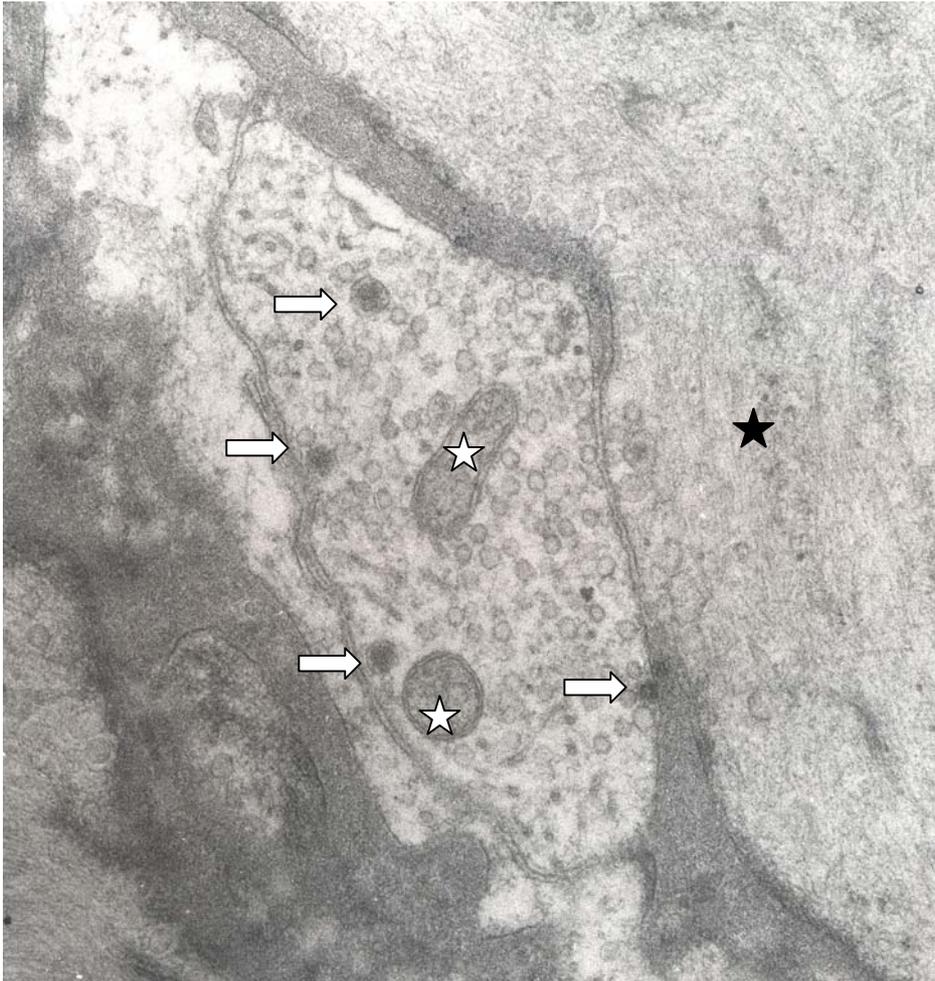


Abbildung 21: Normaler cholinerges Axonendkolben mit reichlich klaren, kleinen Vesikeln, 4 Large dense core vesicles (LCDV Pfeile) und 2 regelrecht konfigurierten Mitochondrien (helle Sterne). Der Abstand zur Muskelzelle (dunkler Stern) beträgt 8nm. Der Axonendkolben ist teilweise von einer Schwann'schen Zelle umgeben (Negativ Nr.: 45368, Vergrößerung x37800).

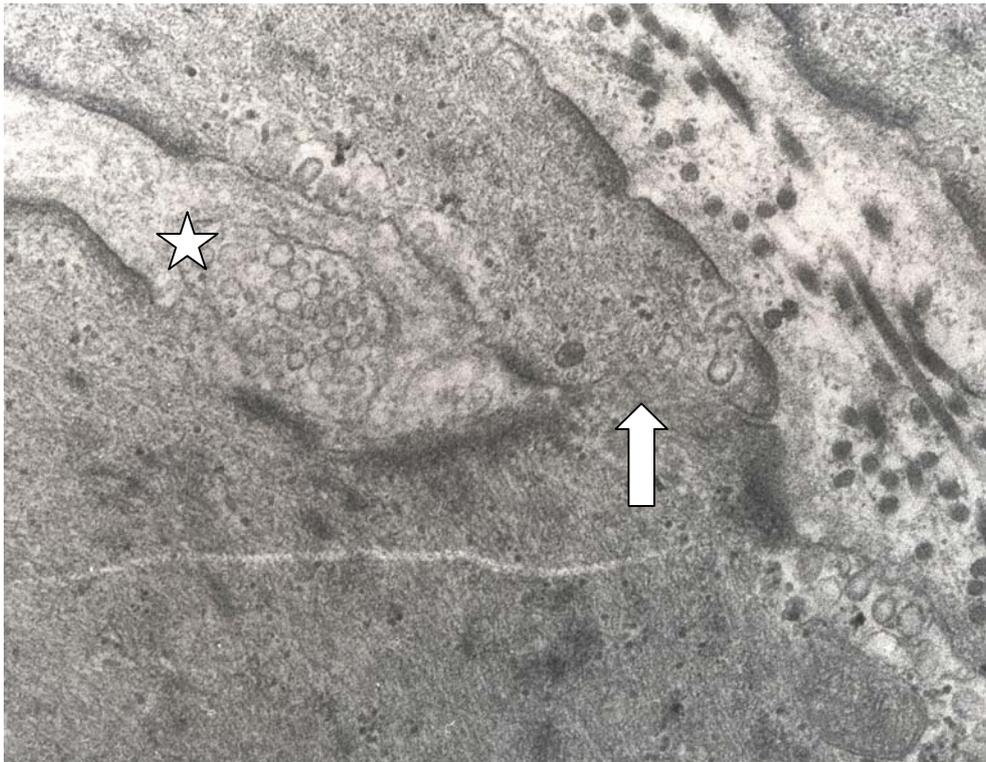


Abbildung 22: Normaler cholinergischer Axonendkolben (Stern) neben einer Intimate Cell Apposition (Pfeil). Der Neuromuskuläre Abstand beträgt 8nm (Negativ Nr.:45258, Vergrößerung x37800).



Abbildung 23: Adrenerger normaler Axonendkolben angefüllt mit granulierten (schwarze Punkte) , kleinen Vesikeln. Abstand zur Muskelzelle 10nm (Negativ Nr.: 46470, Vergrößerung x31050).

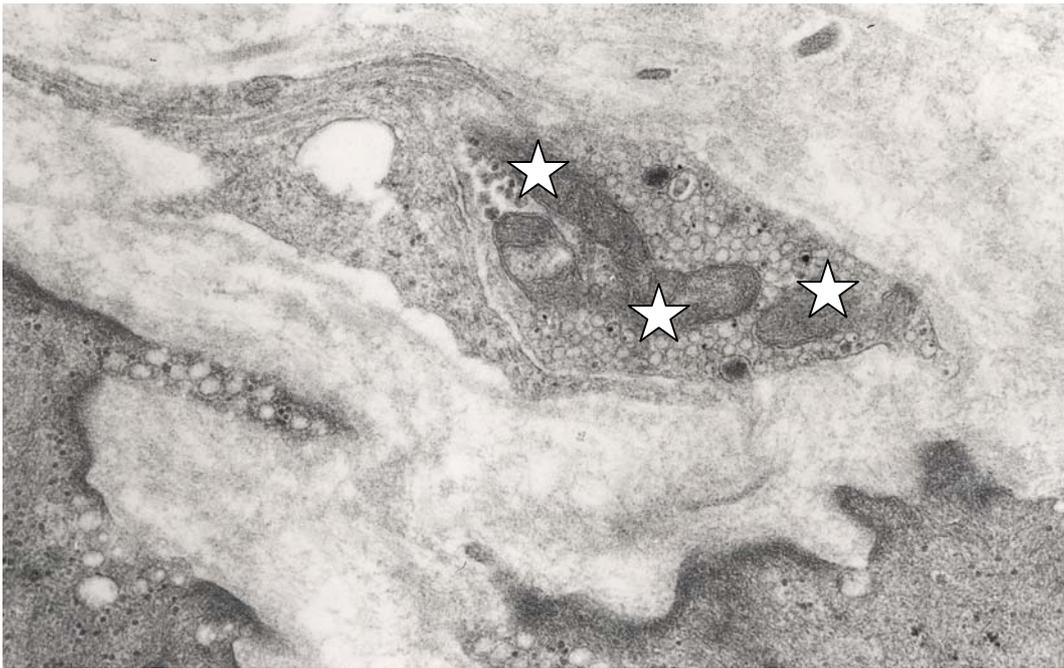


Abbildung 24: Adrenerger normal konfigurierter Axonendkolben mit 3 regelrechten Mitochondrien (Sterne), vielen kleinen, granulierten Vesikeln, 2 LDCV und teilweiser Schwannzellumhüllung. Abstand zur Muskelzelle 193nm (Negativ Nr.: 46648, vergrößerung x31050).



Abbildung 25: Normales cholinerges Axonendkolbenprofil, 1 LDCV und teilweise Umhüllung von Schwann'scher Zelle (Pfeil). Der Abstand zur Muskelzelle beträgt 132nm (Negativ Nr.:45272, Vergrößerung x37800).

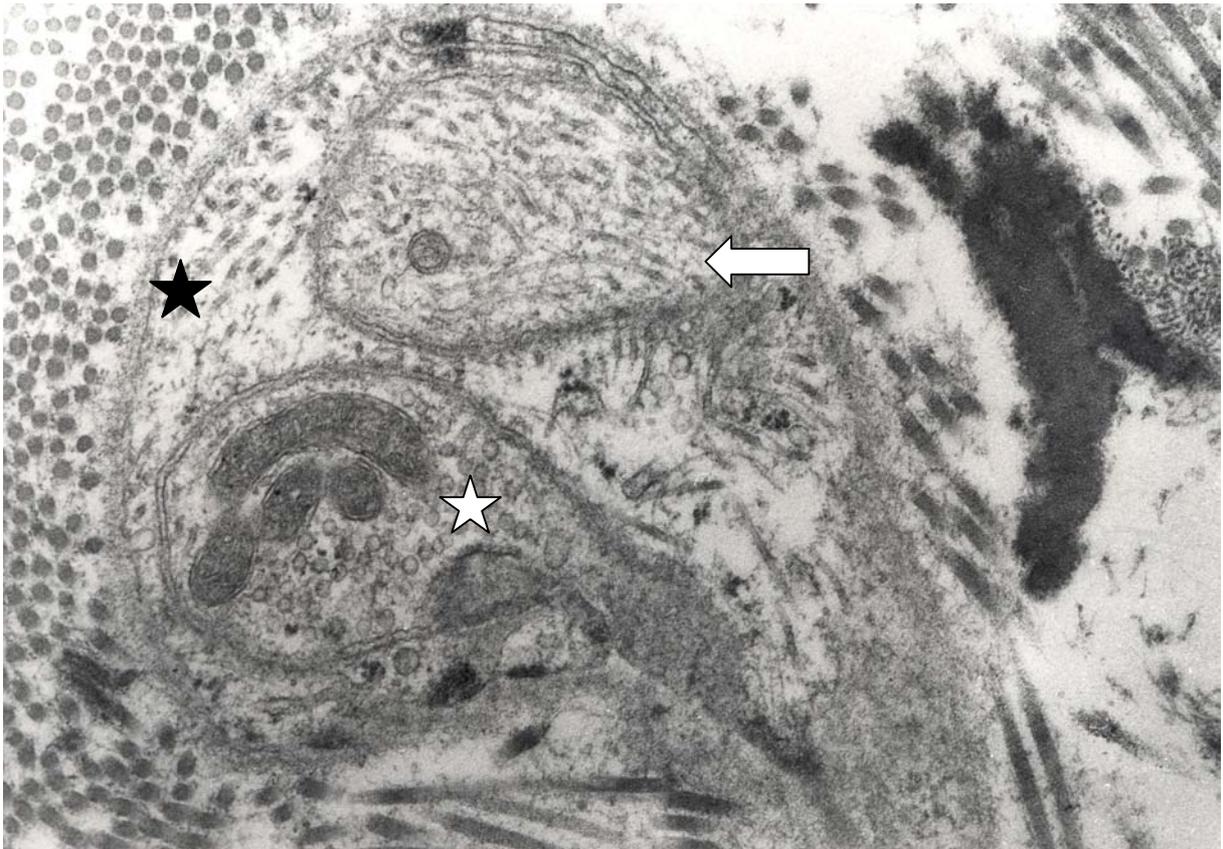


Abbildung 26: Cholinerges Axonpreterminal mit vielen kleinen Vesikeln und 3 normal konfigurierten Mitochondrien (heller Stern). Intervariiköses Segment mit Neurotubuli und kaum kleinen Vesikeln (Pfeil). Beide von Schwann'scher Zelle (dunkler Stern) umgeben (Negativ Nr.: 45276, Vergrößerung x48600).

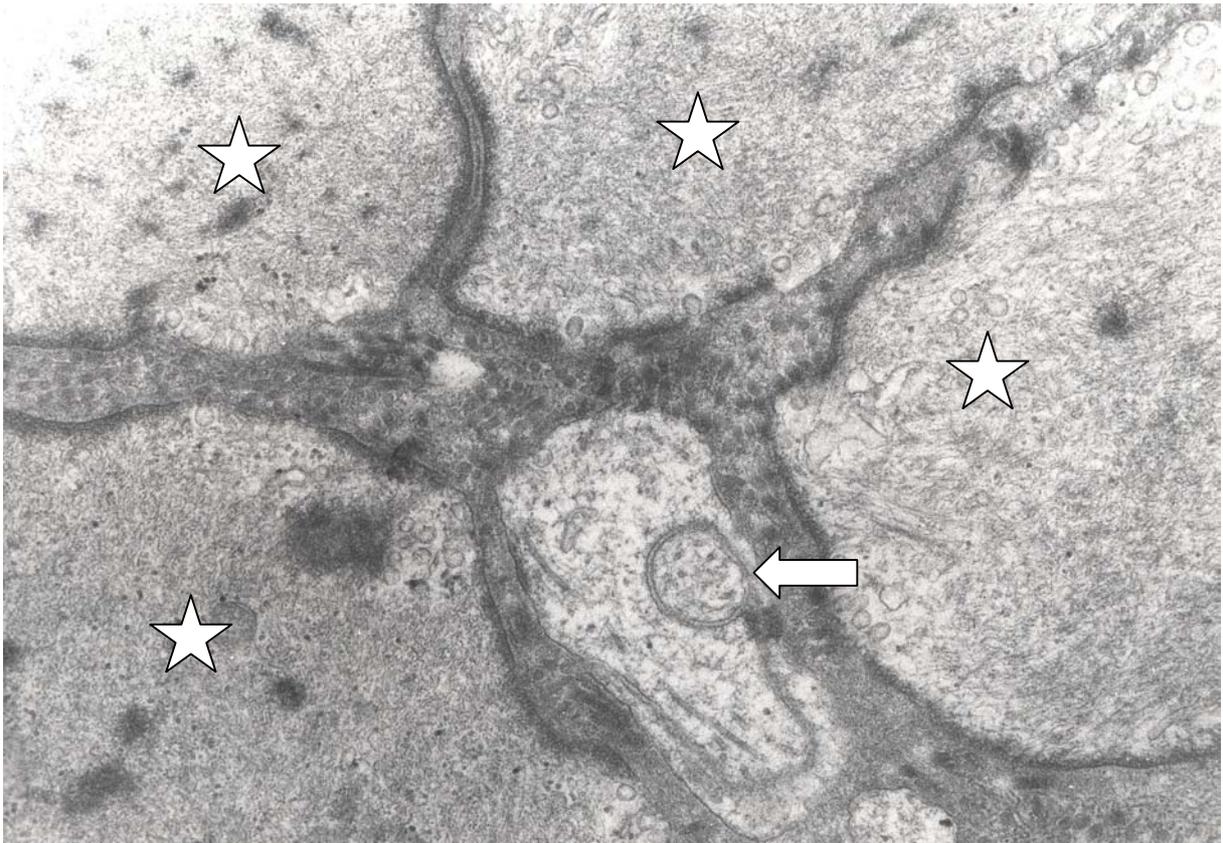


Abbildung 27: Intervariköses Axonsegment (Pfeil) mit Schwann'scher Zelle und Neurotubuli im Inneren umgeben von Muskelzellen (Sterne) (Negativ Nr.: 45287, Vergrößerung x37800).

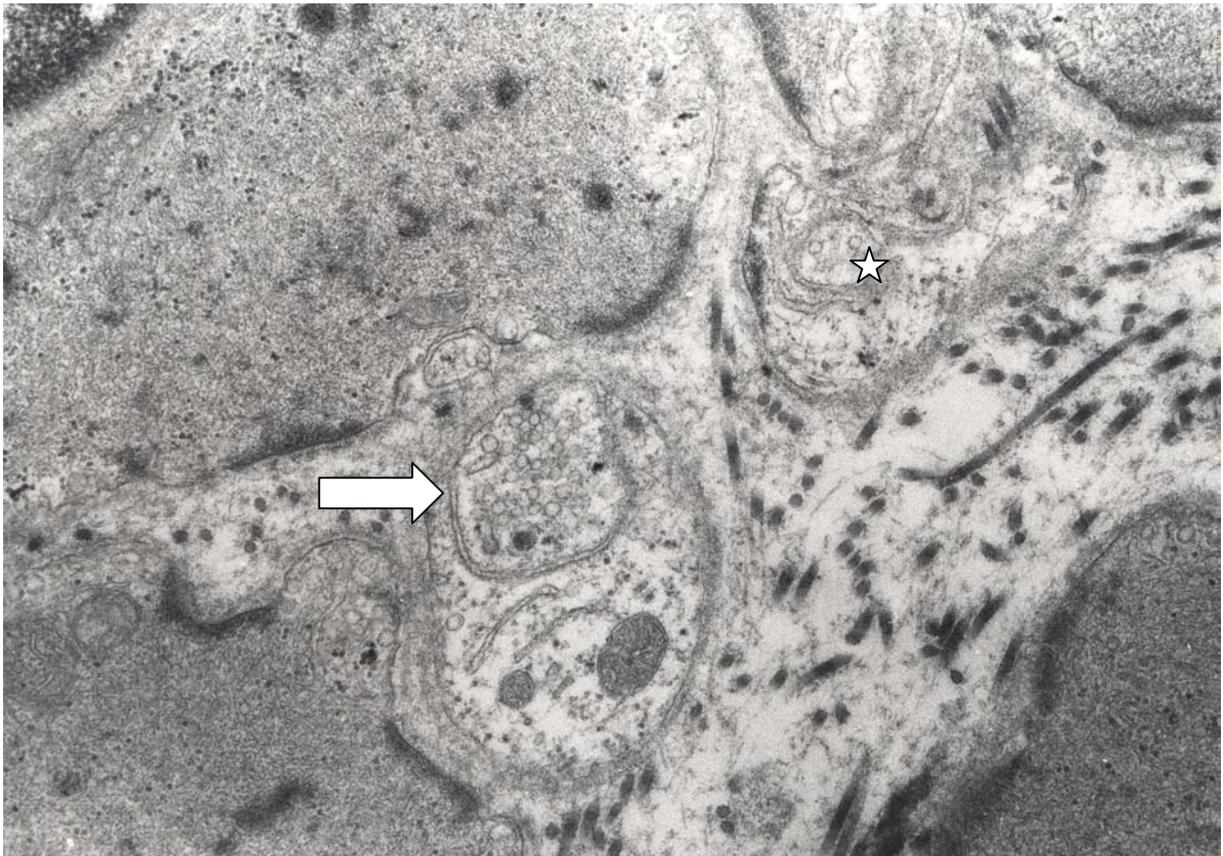


Abbildung 28: Degenerierter cholinerges Axonendkolben mit 2 LDCV und 2 regelrechten Mitochondrien in begleitender Schwann'scher Zelle mit einem neuromuskulären Abstand von 37nm (Pfeil). Degenerierter Axonendkolben mit reduzierten Vesikeln und Abstandsverbreiterung auf 156nm (Stern) (Negativ Nr.: 45274, Vergrößerung x37800).

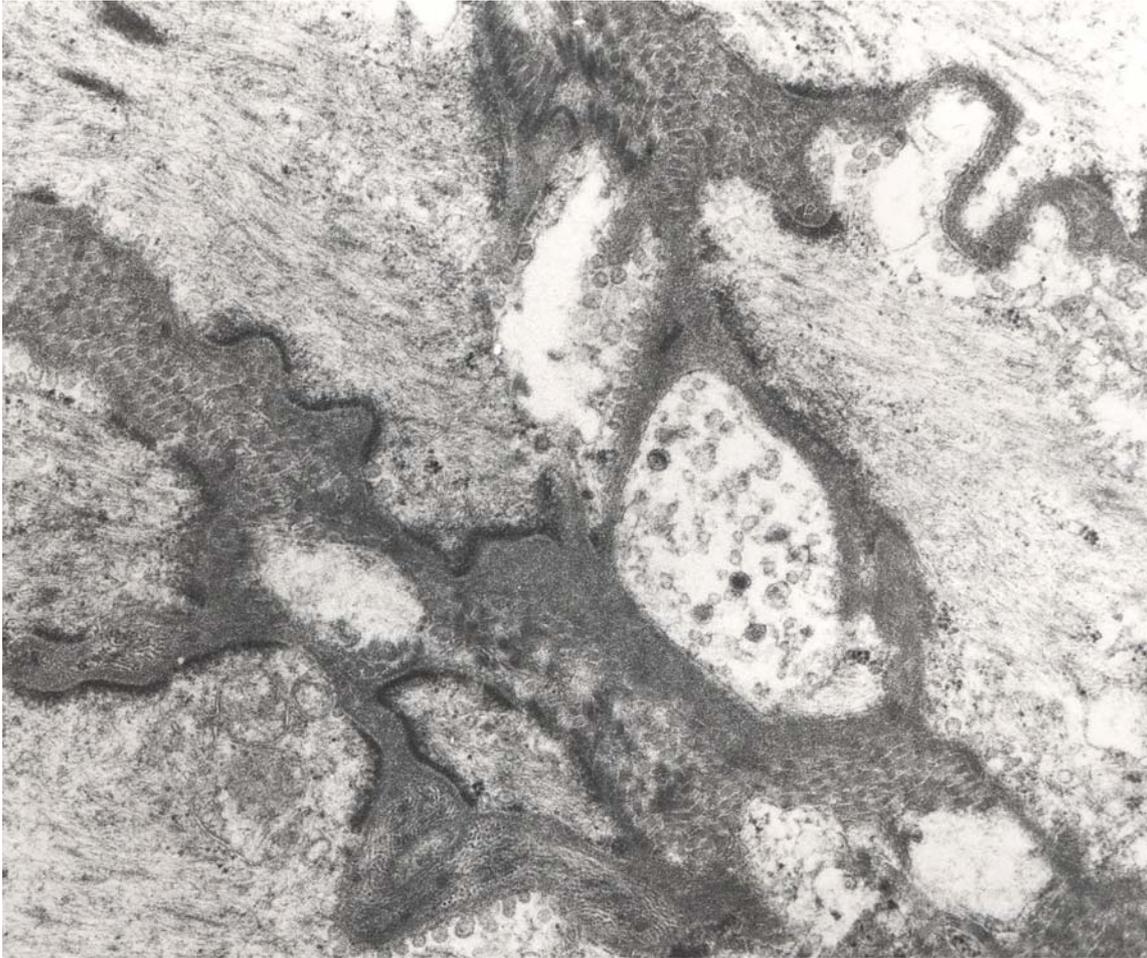


Abbildung 29: Cholinerges Axonendkolben mit reduzierten Vesikeln, 5 LDCV und einem Abstand von 57nm (Negativ Nr.: 45651, Vergrößerung x26400).



Abbildung 30: 2 eher normale cholinerge Axonendkolben mit jeweils verminderten kleinen Vesikeln. Degenerativ verändertes, aufgetriebenes Mitochondrium ohne klar erkennbare Struktur der Cristae (heller Stern) und regelrechtes Mitochondrium (dunkler Stern). Die Abstände zur Muskelzelle betragen 15 und 24nm (Negativ Nr.: 45659, Vergrößerung x26460).

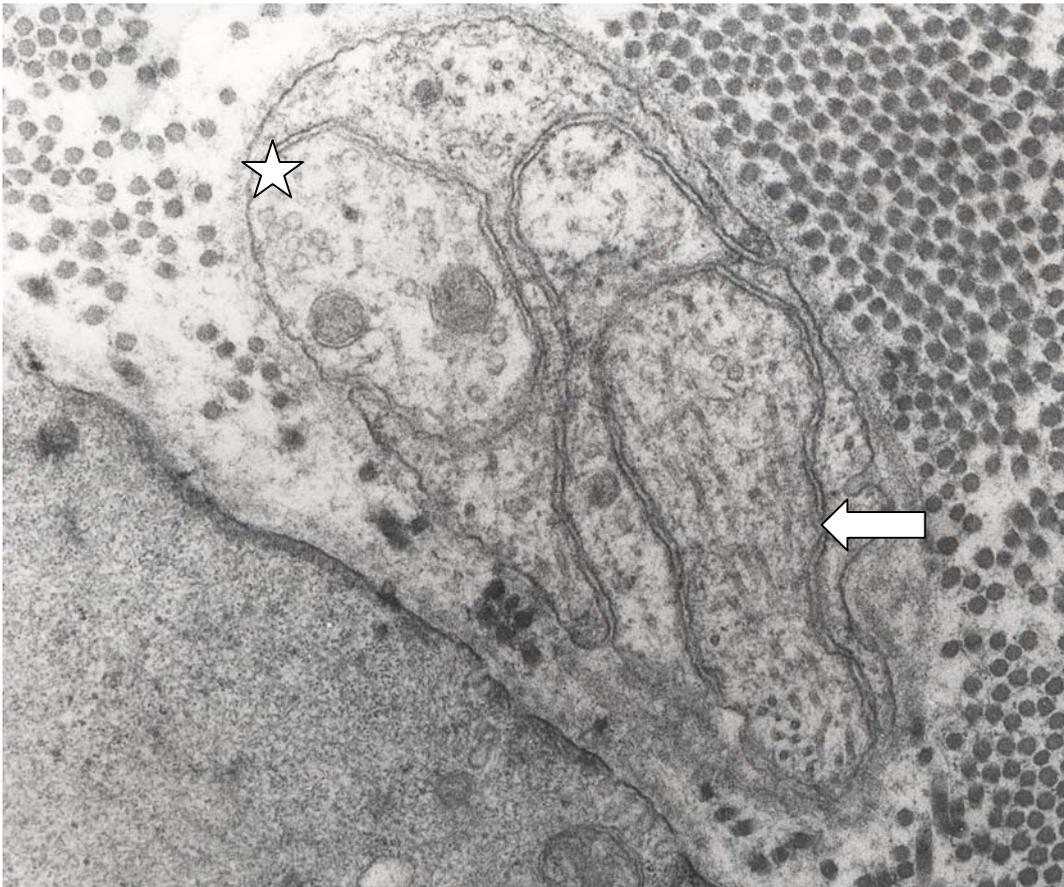


Abbildung 31: Ein degenerierter cholinerges Axonendkolben mit verminderten Vesikeln, 2 regelrechten Mitochondrien und Abstandsverbreiterung zur Muskelzelle von 430nm (Stern). Ein Axonpreterminal mit reduzierten Vesikeln (Pfeil) (Negativ Nr.: 45269, Vergrößerung x48600).



Abbildung 32: Gemischtes Nervenbündel mit einer Vielzahl an myelinisierten und unmyelinisierten Axonen und umgebendem Perineurium (Pfeil) (Negativ Nr.: 45690, Vergrößerung x7425).



Abbildung 33: Normal konfigurierte unmyelinisierte intervariköse Axonsegmente (dunkle Sterne) und umgebende Schwann'sche Zellen (Pfeile), sowie ein myelinisiertes intervariköses Axonsegment mit intakter Myelinscheide (heller Stern) (Negativ Nr.:45708, Vergrößerung x26460).

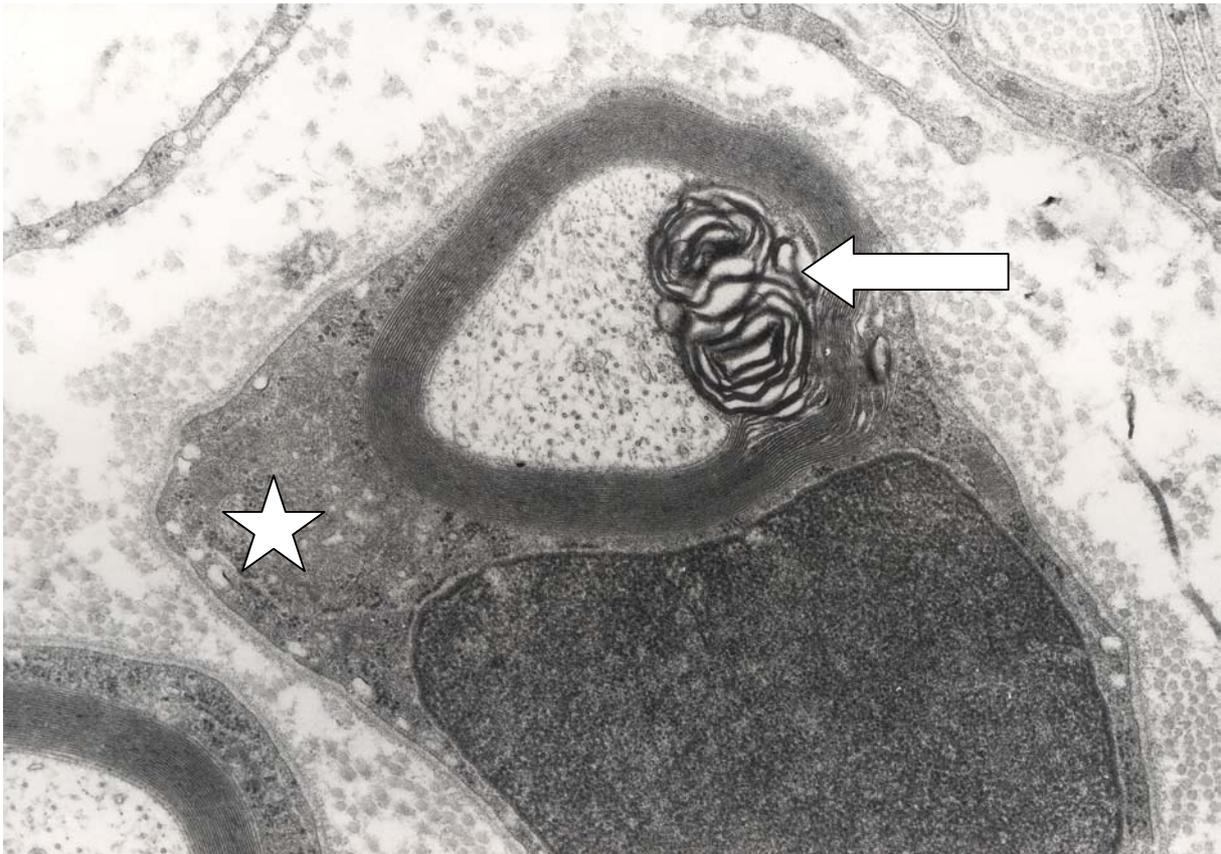


Abbildung 34: Degeneriertes myelinisiertes Axonprofil innerhalb eines Nervenbündels mit deutlich erkennbarer Aufsplitterung der Myelinscheide (Pfeil) und zugehöriger Schwann'scher Zelle (Stern) (Negativ Nr.: 46753, Vergrößerung x31050).

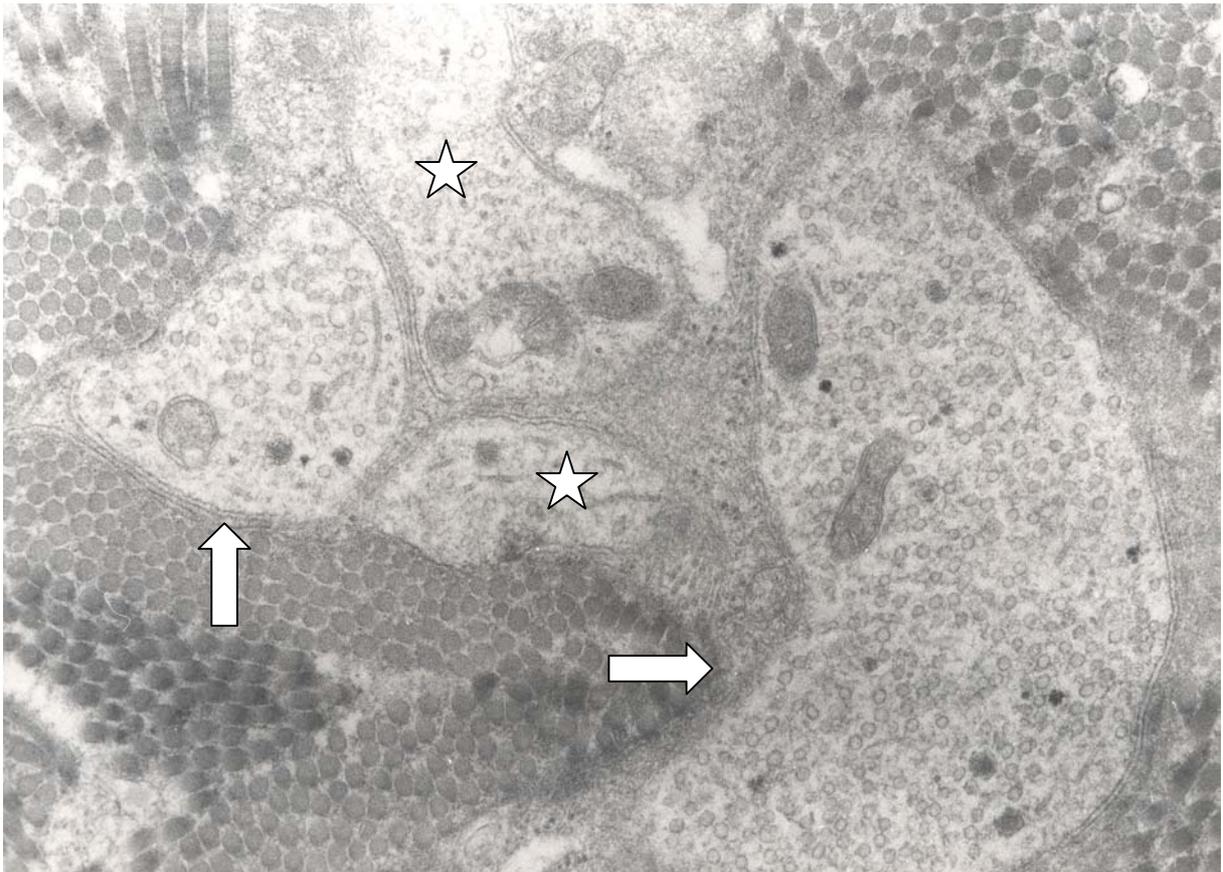


Abbildung 35: 2 cholinerge Axonpreterminals mit reduzierten Vesikeln (Sterne) und 2 cholinerge Axonpreterminals mit vielen kleinen Vesikeln, reichlich LDCV's, aber nur zwei und einem Mitochondrium und somit kopeptiderg (Pfeile) umgeben von Schwann'scher Zelle und viel Kollagen (Negativ Nr.:45187, Vergrößerung x37800).

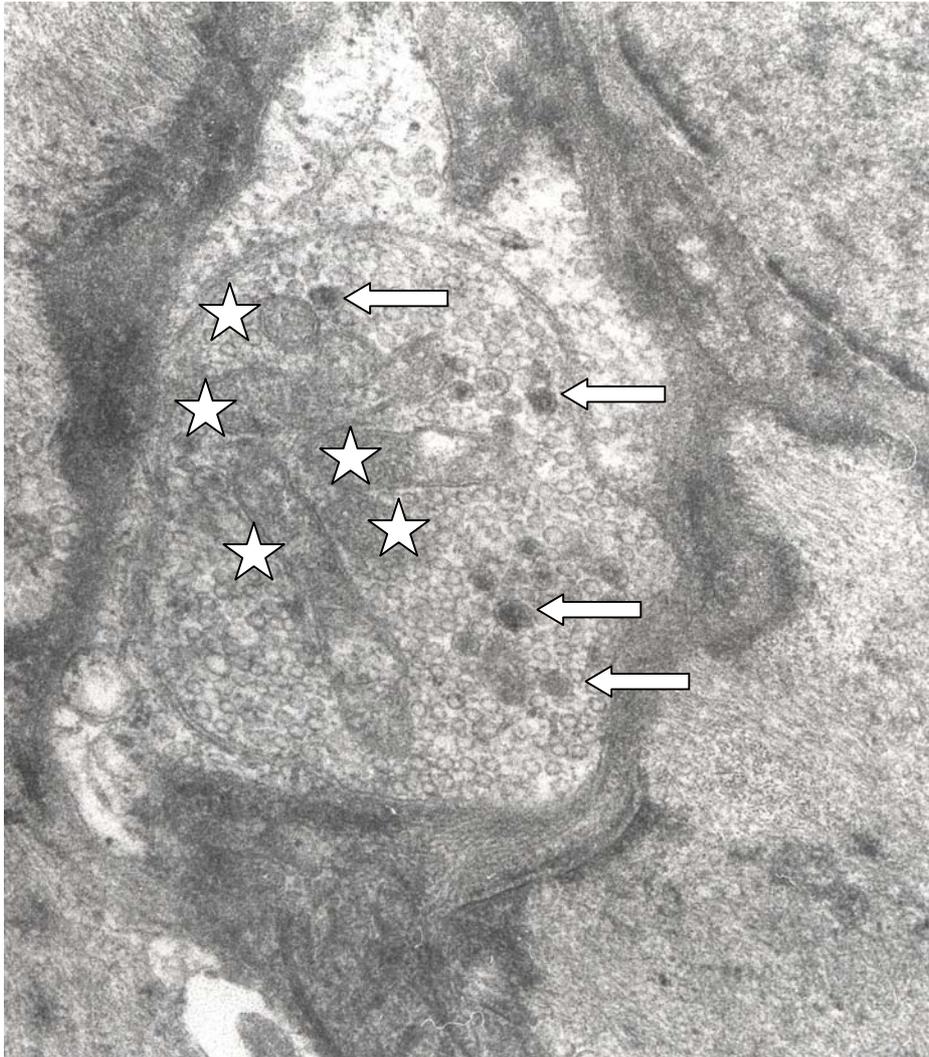


Abbildung 36: Cholinerges aktiv aussprossendes Axonterminal mit reichlich kleinen Vesikeln, vielen LDCV's (Pfeile) und 5 Mitochondrien (Sterne). Abstand zur Muskelzelle 68nm (Negativ Nr.: 45361, Vergrößerung x37800).

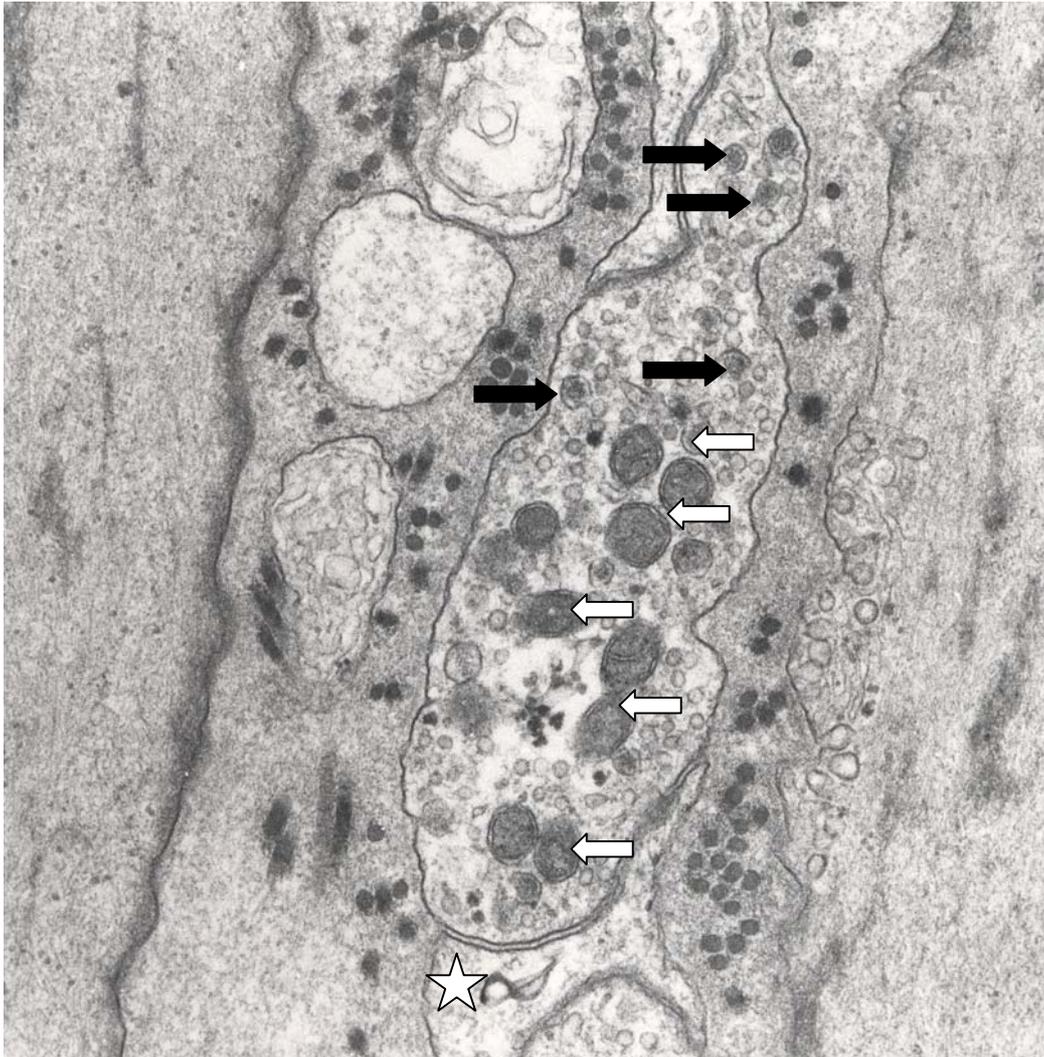


Abbildung 37: Aktiv aussprossendes cholinerges Axonterminal mit 10 Mitochondrien (helle Pfeile), vielen LDCV's (dunkle Pfeile) und vielen kleinen Vesikeln, sowie teilweise umgebender Schwann'scher Zelle (Stern). Abstand zur Muskelzelle 160nm (Negativ Nr.: 45147, Vergrößerung x37800).

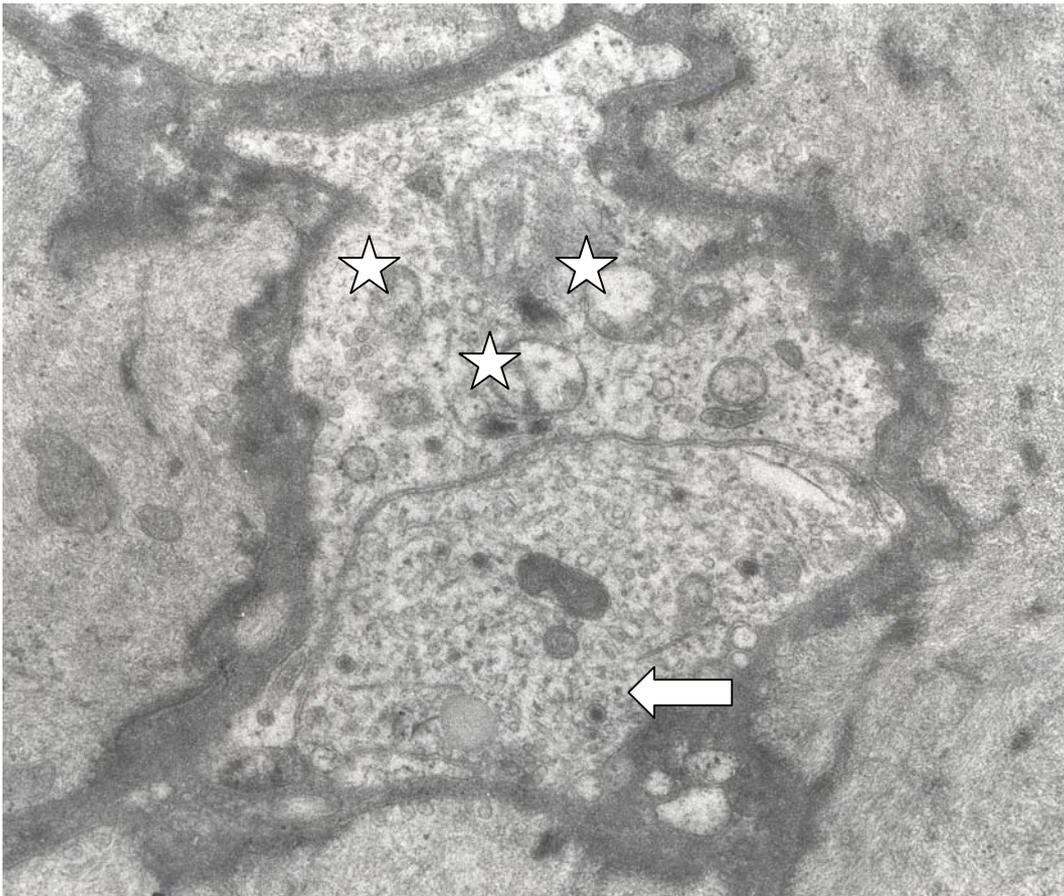


Abbildung 38: Cholinerges kopeptiderges Axonterminal mit normalen kleinen Vesikeln , reichlich LDCV's und teilweise degenerierten Mitochondrien (Pfeil). Aktivierte Schwann`sche Zelle mit vermehrten, jedoch degenerativ veränderten Mitochondrien (Sterne). Abstand zur Muskelzelle 30nm (Negativ Nr.: 45358, Vergrößerung x26460).

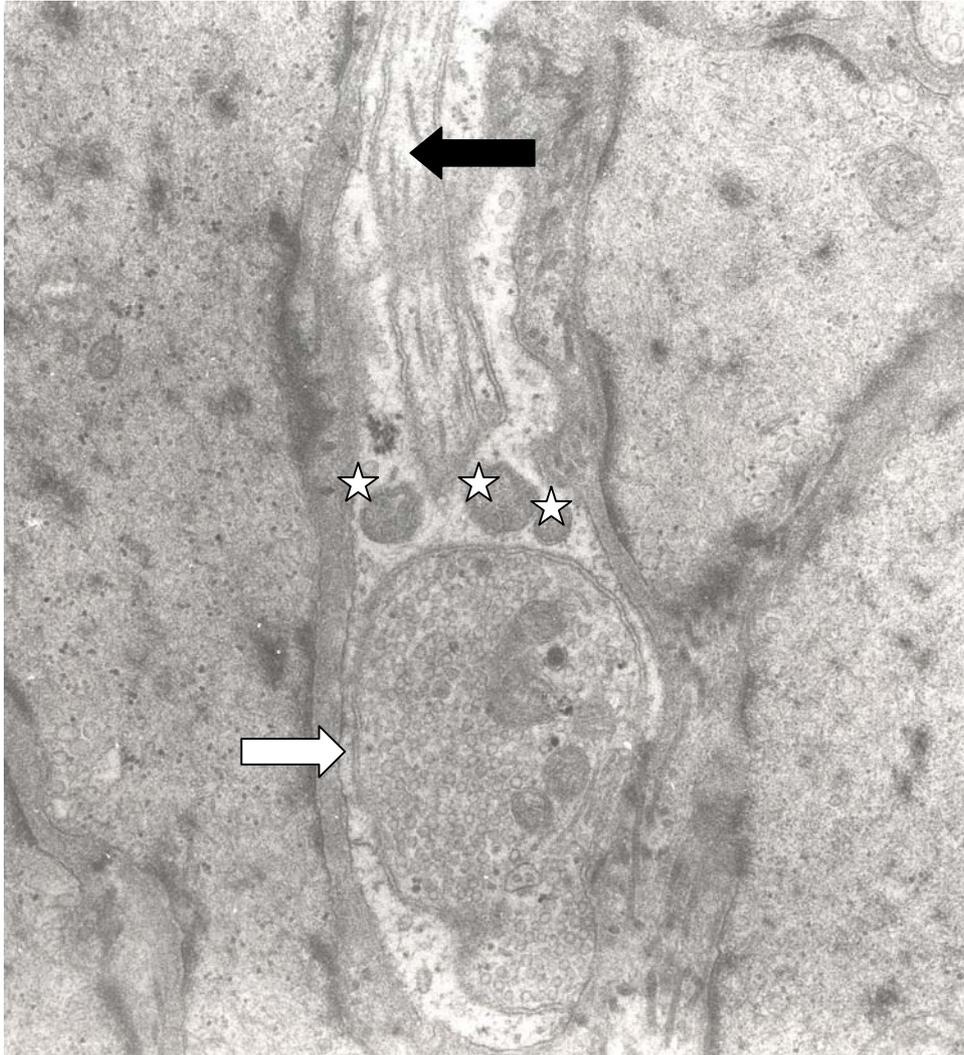


Abbildung 39: Normales cholinerges Axonterminal mit reichlich kleinen Vesikeln, 4 normalen Mitochondrien und 2 LDCV's (heller Pfeil). Aktivierte Schwann'sche Zelle mit einem erhöhten Gehalt an Neurotubuli (dunkler Pfeil) und 3 regelrechten Mitochondrien (Sterne). Abstand zur Muskelzelle 113nm (Negativ Nr.: 45304, Vergrößerung x26460).

8. Literaturverzeichnis

Abrams P, Blaivas JG, Stanton SL, Andersen JT. The standardisation of terminology of lower urinary tract function. The International Continence Society Committee on Standardisation of Terminology. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1988; 114: 5-19

Abrams P, Larsson G, Chapple C, Wein AJ. Factors involved in the success of antimuscarinic treatment. *BJU Int* 1999; 83 Suppl 2:42-7.: 42-47

Alken P, Radler H. Urolithiasis. In: Alken P, Walz PH, Hrsg. *Urologie*. Weinheim: Chapman & Hall, 1998: 267-293

Alken P, Walz HP. Kinderurologie. In: Alken P, Walz HP, Hrsg. *Urologie*. Weinheim: VCH, 1992a: 318-361

Alken P, Walz HP. Neurourologie und Urodynamik. In: Alken P, Walz HP, Hrsg. *Urologie*. Weinheim: VCH, 1992b: 386-409

Atta MA, Franck JI, Elbadawi A. Intrinsic Neuromuscular Defects in the Neurogenic Bladder II. *Neurourol Urodyn* 1984; 3: 185-200

Barber KE, Cross RR. The urinary tract as a cause of death in paraplegia. *J Urol* 1952; 67: 494-502

Barisic N, Perovic D, Mitrovic Z, Jurenic D, Zagar M. Assessment of war and accidental nerve injuries in children. *Pediatr Neurol* 1999; 21: 450-455

Bhakta BB, Cozens JA, Chamberlain MA, Bamford JM. Treatment of chronic limb spasticity with botulinum toxin A. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 562-562

Blomjous CE, Thunnissen FB, Vos W, de Voogt HJ, Meijer CJ. Small cell neuroendocrine carcinoma of the urinary bladder. An immunohistochemical and ultrastructural evaluation of 3 cases with a review of the literature. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1988; 413: 505-512

Bloom DA. Normale und neurogen gestörte Funktion des unteren Harntraktes bei Kindern mit Myelomenigozele und posttraumatischer Querschnittlähmung: urodynamisch orientierte Behandlung. In: Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H, Hrsg. Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung. Berlin - Heidelberg: Springer, 1997: 225-231

Bluemcke S. Electronoptic studies on schwann's cells during initial degeneration and early regeneration. *Beitr Pathol Anat* 1963; 128:238-58.: 238-258

Bluemcke S., Niedorf HR. Electron microscopic studies on lamellar bodies in regenerating peripheral nerves. *Beitr Pathol Anat* 1965; 131:38-62.: 38-62

Bomze HM, Bulsara KR, Iskandar BJ, Caroni P, Skene JH. Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4: 38-43

Borodic GE, Cozzolino D. Blepharospasm and its treatment, with emphasis on the use of botulinum toxin. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83: 546-554

Borodic GE, Ferrante R. Effects of repeated botulinum toxin injections on orbicularis oculi muscle. *J Clin Neuroophthalmol* 1992; 12: 121-127

Bors E, Comarr A. Neurological Urology. Basel: Karger, 1971

Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1995; 378: 498-501

Brindley GS, Craggs MD. Proceedings: The effect of atropine on the urinary bladder of the baboon and of man. *J Physiol* 1976; 256: 55-55

Burgdörfer H, Heidler H, Madersbacher H, Palmtag H, Richter R, Rist M, Sauerwein D, Stöhrer M. Leitlinien urologischer Betreuung Querschnittgelähmter. *Urologe A* 1998; 37: 221-228

Chancellor MB. Should we be using chili pepper extracts to treat the overactive bladder? *J Urol* 1997; 158: 2097-2097

Chancellor MB, de Groat WC. Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways to treat the overactive bladder. *J Urol* 1999; 162: 3-11

Cruz F. Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin or capsaicin analogs. A new strategy for treatment of urge incontinence in patients with spinal detrusor hyperreflexia or bladder hypersensitivity disorders. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1998; 9: 214-220

Daniel EE, Cowan W, Daniel VP. Structural bases for neural and myogenic control of human detrusor muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1983; 61: 1247-1273

De Groat WC. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* 1997; 50: 36-52

De Groat WC, Kruse MN, Vizzard MA, Cheng CL, Araki I, Yoshimura N. Modification of urinary bladder function after spinal cord injury. *Adv Neurol* 1997; 72: 347-364

De Paiva A, Meunier FA, Molgo J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3200-3205

De Ridder D, Chandiramani V, Dasgupta P, Van Poppel H, Baert L, Fowler CJ. Intravesical capsaicin as a treatment for refractory detrusor hyperreflexia: a dual center study with long-term followup. *J Urol* 1997; 158: 2087-2092

De Seze M, Wiart L, Joseph PA, Dosque JP, Mazaux JM, Barat M. Capsaicin and neurogenic detrusor hyperreflexia: a double-blind placebo-controlled study in 20 patients with spinal cord lesions. *Neurourol Urodyn* 1998; 17: 513-523

Delank HW, Gehlen W. Allgemeine Therapie neurologischer Krankheiten. In: Delank HW, Gehlen W, Hrsg. Neurologie. Stuttgart: Enke, 1999: 405-411

Elbadawi A. Autonomic muscular innervation of the vesikal outlet and its role in micturation. In: Hinman F, Boyarsky S, Caine M, Hrsg. Benign prostatic hypertrophy. New York: Springer, 1983: 330-348

Elbadawi A. Microstructural basis of detrusor contractility: The MIN aproach to its understanding and study. *Neurourol Urodyn* 1991; 10: 77-85

Elbadawi A. Functional pathology of urinary bladder muscularis: the new frontier in diagnostic uropathology. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 314-354

Elbadawi A. Functional anatomy of the organs of micturition. *Urol Clin North Am* 1996; 23: 177-210

Elbadawi A. The neostructural myogenic mechanism of detrusor overactivity. *Urology* 1997; 50: 71-72

Elbadawi A, Atta MA. Intrinsic neuromuscular defects in the neurogenic bladder. III.: Transjunctional, short-and long-term ultrastructural changes in muscle cells of the decentralized feline bladder base following unilateral sacral central rhizotomy. *Neurourol Urodyn* 1984; 3: 245-270

Elbadawi A, Atta MA, Franck JI. Intrinsic Neuromuscular Defects in the Neurogenic Bladder I. *Neurourol Urodyn* 1984; 3: 93-113

Elbadawi A, Atta MA, Hanno AGE. Intrinsic neuromuscular defects in the neurogenic bladder. VIII. Effects of unilateral pelvic and pelvic plexus neurectomy on ultrastructure of the feline bladder base. *Neurourol Urodyn* 1988; 7: 77-92

Elbadawi A, Hailemariam S, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. VI. Validation and update of diagnostic criteria in 71 detrusor biopsies. *J Urol* 1997; 157: 1802-1813

Elbadawi A, Resnick NM, Dorsam J, Yalla SV, Haferkamp A. Structural basis of neurogenic bladder dysfunction. I. Methods of prospective ultrastructural study and overview of the findings. *J Urol* 2003; 169: 540-546

Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. I. Methods of a prospective ultrastructural/urodynamic study and an overview of the findings. *J Urol* 1993a; 150: 1650-1656

Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. II. Aging detrusor: normal versus impaired contractility. *J Urol* 1993b; 150: 1657-1667

Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. III. Detrusor overactivity. *J Urol* 1993c; 150: 1668-1680

Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. IV. Bladder outlet obstruction. *J Urol* 1993d; 150: 1681-1695

Fertl E, Schnider P, Schneider B, Auff E. Remote effects of chronic botulinum toxin treatment: electrophysiologic results Do not indicate subclinical remodelling of noninjected muscles. *Eur Neurol* 2000; 44: 139-143

Fowler CJ. Intravesical treatment of overactive bladder. *Urology* 2000; 55: 60-64

Fowler CJ, Beck RO, Gerrard S, Betts CD, Fowler CG. Intravesical capsaicin for treatment of detrusor hyperreflexia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 169-173

Frey D, Laux T, Xu L, Schneider C, Caroni P. Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J Cell Biol* 2000; 149: 1443-1454

Friede RL, Martinez AJ. Analysis of axon-sheath relations during early Wallerian degeneration. *Brain Res* 1970; 19: 199-212

Glantz, S.A. *Primer of Biostatistics*. New York: Mc Graw-Hill Inc., 1996

Gomez-Ramirez AM, Villegas-Perez MP, Miralles d, I, Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M. Effects of intramuscular injection of botulinum toxin and doxorubicin on the survival of abducens motoneurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 414-424

Grundy DJ, Rainford DJ, Silver JR. The occurrence of acute renal failure in patients with neuropathic bladders. *Paraplegia* 1982; 20: 35-42

Guttmann L, Frankel H. The value of intermittent catheterisation in the early management of traumatic paraplegia and tetraplegia. *Paraplegia* 1966; 4: 63-84

Haferkamp A, Dorsam J, Resnick NM, Yalla SV, Elbadawi A. Structural basis of neurogenic bladder dysfunction. II. Myogenic basis of detrusor hyperreflexia. *J Urol* 2003a; 169: 547-554

Haferkamp A, Dorsam J, Resnick NM, Yalla SV, Elbadawi A. Structural basis of neurogenic bladder dysfunction. III. Intrinsic detrusor innervation. *J Urol* 2003b; 169: 555-562

Hailemariam S, Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. V. Standardized protocols for routine ultrastructural study and diagnosis of endoscopic detrusor biopsies. *J Urol* 1997; 157: 1783-1801

Harris CP, Alderson K, Nebeker J, Holds JB, Anderson RL. Histologic features of human orbicularis oculi treated with botulinum A toxin. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 393-395

Hauri D, Jaeger P. Neurogene Blasenfunktionsstörungen. In: Hauri D, Jaeger P, Hrsg. *Urologie Checkliste*. New York: Thieme, 2000: 226-234

Hautmann RE, Huland H. Neurogene Blase. In: Hautmann RE, Huland H, Hrsg. *Urologie*. Berlin-Heidelberg: Springer, 2001: 418-430

Holds JB, Alderson K, Fogg SG, Anderson RL. Motor nerve sprouting in human orbicularis muscle after botulinum A injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 964-967

John H, Hauri D, Bangerter U, Elbadawi A. Ultrastructure of the trigone and its functional implications. *Urol Int* 2001; 67: 264-271

Junqueira LC, Carneiro J. Nervengewebe. In: Schiebler T, Hrsg. *Histologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1996: 242-282

Juzans P, Comella JX, Molgo J, Faille L, Angaut-Petit D. Nerve terminal sprouting in botulinum type-A treated mouse levator auris longus muscle. *Neuromuscul Disord* 1996; 6: 177-185

Kamijo Y, Koyama J, Oikawa S, Koizumi Y, Yokouchi K, Fukushima N, Moriizumi T. Regenerative process of the facial nerve: rate of regeneration of fibers and their bifurcations. *Neurosci Res* 2003; 46: 135-143

Kao I, Drachman DB, Price DL. Botulinum toxin: mechanism of presynaptic blockade. *Science* 1976; 193: 1256-1258

Karow T. Herz-Kreislauf. In: Karow T, Lang R, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Köln: 2001: 35-266

Kinder RB, Mundy AR. Atropine blockade of nerve-mediated stimulation of the human detrusor. *Br J Urol* 1985; 57: 418-421

Knoche H, Terwort H. [An electron microscopic study of degenerating autonomic terminals following section of postganglionic fibres (author's transl)]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1973; 141: 181-202

Lampert PW. A comparative electron microscopic study of reactive, degenerating, regenerating, and dystrophic axons. *J Neuropathol Exp Neurol* 1967; 26: 345-368

- Lapides J, Diokno AC, Silber SJ, Lowe BS. Clean, intermittent self-catheterization in the treatment of urinary tract disease. *J Urol* 1972; 107: 458-461
- Leippold T, Reitz A, Schurch B. Botulinum toxin as a new therapy option for voiding disorders: current state of the art. *Eur Urol* 2003; 44: 165-174
- Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9:409-14.: 409-414
- Madersbacher H, Fischer J, Ebner A. Anterior sacral root stimulator (Brindley): Experiences especially in woman with neurogenic urinary incontinence. *Neurourol Urodyn* 1988; 7: 593-601
- Maggi CA. Therapeutic potential of capsaicin-like molecules: studies in animals and humans. *Life Sci* 1992; 51: 1777-1781
- Maynard FM, Jr., Bracken MB, Creasey G, Ditunno JF, Jr., Donovan WH, Ducker TB, Garber SL, Marino RJ, Stover SL, Tator CH, Waters RL, Wilberger JE, Young W. International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal Cord* 1997; 35: 266-274
- McGuire EJ, Ohl DA, Noll F. Die Pathophysiologie der neurogenen Blasenstörung. In: Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H, Hrsg. Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung. Berlin - Heidelberg: Springer, 1997: 5-17
- McGuire EJ, Woodside JR, Borden TA. Upper urinary tract deterioration in patients with myelodysplasia and detrusor hypertonia: a followup study. *J Urol* 1983; 129: 823-826
- Millonig G. A modified procedure for lead staining of thin sections. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 11:736-9.: 736-739
- Mugnaini E, Friederich VL. Electron Microscopy - Identification and study of normal and degenerating neural elements by electron microscopy. In: Heimer L, Robards MJ, Hrsg. Neuroanatomical Tract-Tracing methods. New York - London: Plenum Press, 1981: 377-406

Nathaniel EJ, Pease DC. Collagen and basement membrane formation by schwann cells during nerve regeneration. *J Ultrastruct Res* 1963; 52:550-60.: 550-560

Naumann M, Flachenecker P, Brocker EB, Toyka KV, Reiners K. Botulinum toxin for palmar hyperhidrosis. *Lancet* 1997a; 349: 252-252

Naumann M, Zellner M, Toyka KV, Reiners K. Treatment of gustatory sweating with botulinum toxin. *Ann Neurol* 1997b; 42: 973-975

Nitze H, Kerjaschki D. Niere. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU, Hrsg. *Pathologie*. München - Jena: Urban & Fischer, 2001: 777-807

Pasricha PJ, Rai R, Ravich WJ, Hendrix TR, Kalloo AN. Botulinum toxin for achalasia: long-term outcome and predictors of response. *Gastroenterology* 1996; 110: 1410-1415

Payer AF. An ultrastructural study of Schwann cell response to axonal degeneration. *J Comp Neurol* 1979; 183: 365-383

Reitz A, Stöhrer M, Kramer G, Del Popolo G, Chartier-Kastler E, Pannek J, Burgdorfer H, Gocking K, Madersbacher H, Schumacher S, Richter R, von Tobel J, Schurch B. European experience of 200 cases treated with botulinum-A toxin injections into the detrusor muscle for urinary incontinence due to neurogenic detrusor overactivity. *Eur Urol* 2004a; 45: 510-515

Reitz JvT, Stöhrer M, Kramer G, Del Popolo G, Pannek J, Chartier-Kastler E, Richter R, Burgdorfer H, Haferkamp A, Madersbacher H, Schurch B. European experience of 184 cases treated with botulinum A toxin injections into the detrusor muscle for neurogenic incontinence. *Neurourol Urodyn* 2004b; 21: 113-113

Richardson KC, Jarett L, Finke EH. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 1960; 35:313-23.: 313-323

Roth ST, Semjonow A, Rahtert P. Blasenentleerungsstörungen. In: Roth ST, Semjonow A, Rahtert P, Hrsg. *Klinische Urologie*. New York: Springer, 1993: 191-201

Rübben H. Entzündungen. In: Altwein JE, Rübben H, Hrsg. Urologie. Stuttgart: Enke, 1993a: 147-179

Rübben H. Pathomechanismen, allgemeine Symptomatologie und Prinzipien der Therapie. In: Altwein JE, Rübben H, Hrsg. Urologie. Stuttgart: Enke, 1993b: 1-31

Schafer R, Wernig A. Polyclonal antibodies against NCAM reduce paralysis-induced axonal sprouting. *J Neurocytol* 1998; 27: 615-624

Schäfer W, Abrams P, Liao L, Mattiasson A, Pesce F, Spangberg A, Sterling AM, Zinner NR, van Kerrebroeck P. Good urodynamic practices: uroflowmetry, filling cystometry, and pressure-flow studies. *Neurourol Urodyn* 2002; 21: 261-274

Schulte-Baukloh H, Knispel HH. [Botulinum toxin in urology. An inventory]. *Urologe A* 2004; 43: 963-975

Schulte-Baukloh H, Michael T, Schobert J, Stolze T, Knispel HH. Efficacy of botulinum-a toxin in children with detrusor hyperreflexia due to myelomeningocele: preliminary results. *Urology* 2002; 59: 325-327

Schulte-Baukloh H, Michael T, Sturzebecher B, Knispel HH. Botulinum-a toxin detrusor injection as a novel approach in the treatment of bladder spasticity in children with neurogenic bladder. *Eur Urol* 2003; 44: 139-143

Schurch B. Neurogene Blasenfunktionsstörungen. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130: 1618-1626

Schurch B, Stohrer M, Kramer G, Schmid DM, Gaul G, Hauri D. Botulinum-A toxin for treating detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to anticholinergic drugs? Preliminary results. *J Urol* 2000; 164: 692-697

Schwab ME. Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends Neurosci* 1990; 13: 452-456

Scott AB, Kennedy RA, Stubbs HA. Botulinum A toxin injection as a treatment for blepharospasm. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 347-350

Siegel SG, Patton B, English AW. Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Exp Neurol* 2000; 166: 205-212

Simpson DM. Treatment of spasticity with botulinum toxin. *Muscle Nerve* 2000; 23: 447-449

Smith CP, Franks ME, McNeil BK, Ghosh R, de Groat WC, Chancellor MB, Somogyi GT. Effect of botulinum toxin A on the autonomic nervous system of the rat lower urinary tract. *J Urol* 2003; 169: 1896-1900

Sökeland J, Rübber H. Komplikationen bei neurologischen Erkrankungen. In: Sökeland J, Hrsg. *Urologie*. New York: Thieme, 1993: 392-399

Spahn B, Gerner HJ. Querschnittlähmung. In: Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie - Berufsverband der Ärzte für Orthopädie, Hrsg. *Leitlinien der Orthopädie*. Köln: Deutscher Ärzteverlag, 2002: 165-174

Stöhrer M. Neurogene Blasenfunktionsstörungen. In: Jocham D, Miller K, Hrsg. *Praxis der Urologie*. Stuttgart: Thieme, 2003: 317-335

Stöhrer M, Burgdörfer H, Goepel M. Der intermittierende Katheterismus. In: Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H, Hrsg. *Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung*. Berlin - Heidelberg: Springer, 1997a: 141-148

Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H. *Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung*. Berlin - Heidelberg: Springer, 1997b

Stöhrer M, Schurch B, Kramer G, Schmid D, Gaul G, Hauri D. Botolinum-A Toxin in the treatment of detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: A new alternative to medical and surgical procedures? *Neurourol Urodyn* 1999; 18: 401-402

Sullivan MP, Yalla SV. Detrusor contractility and compliance characteristics in adult male patients with obstructive and nonobstructive voiding dysfunction. *J Urol* 1996; 155: 1995-2000

Tanagho EA, Schmidt RA. Neurogene Blasenerkrankungen. In: Tanagho EA, Emil A, Hrsg. *Smiths Urologie*. Berlin - Stuttgart: 1992: 536-559

Trepel M. Vegetatives Nervensystem. In: Trepel M, Hrsg. *Neuroanatomie - Struktur und Funktion*. München - Jena: Urban und Fischer, 1999: 261-279

Van Putten MJ, Padberg M, Tavy DL. In vivo analysis of end-plate noise of human extensor digitorum brevis muscle after intramuscularly injected botulinum toxin type A. *Muscle Nerve* 2002; 26: 784-790

Vizzard MA. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction. *Exp Neurol* 2000; 161: 273-284

Watanabe T, Rivas DA, Chancellor MB. Urodynamics of spinal cord injury. *Urol Clin North Am* 1996; 23: 459-473

Wetterhauer U, Ruitishauser G, Sommerkamp H. Harnblasenentleerungsstörungen. In: Wetterhauer U, Ruitishauser G, Sommerkamp H, Hrsg. *Urologie*. Berlin: De Gruyter, 1995: 170-180

White CM, Greensmith L, Vrbova G. Repeated stimuli for axonal growth causes motoneuron death in adult rats: the effect of botulinum toxin followed by partial denervation. *Neuroscience* 2000; 95: 1101-1109

Yoshimura N, De Groat WC. Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol* 1997; 4: 111-125

Zhou L, Baumgartner BJ, Hill-Felberg SJ, McGowen LR, Shine HD. Neurotrophin-3 expressed in situ induces axonal plasticity in the adult injured spinal cord. *J Neurosci* 2003; 23: 1424-1431

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. S.C. Müller danke ich für die Überlassung des Themas der Arbeit und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Für die ständige Beratung, Unterstützung und Betreuung bei Fragen und Problemen im Zusammenhang mit der Arbeit sowie für kritische Hinweise und Korrekturen, danke ich insbesondere Herrn PD Dr. med. A. Haferkamp.

Ich bedanke mich bei ganz besonders bei Herrn Jörg Bedorf für die praktische Anleitung und Hilfe im Rahmen des experimentellen Teils sowie bei der Erstellung des Bildmaterials und seine ständige Motivation und die Kunst, für angenehme Arbeitsbedingungen zu sorgen. Auch den anderen Mitarbeitern der Abteilung für experimentelle Pathologie und Elektronenmikroskopie am pathologischen Institut der Universität Bonn gebührt mein Dank, denn ohne deren Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. med. Hans-Jürgen Woske für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit auf Fehler und seine ständigen guten Ratschläge sowohl beruflich als auch privat. □

Abschließend danke ich zutiefst Frau Verena Franz für Ihre ständige Begleitung, Motivation und Liebe, ohne die ich wahrscheinlich schon längst aufgegeben hätte. □ □

